

WIRKUNG VON TRENIMON, NATRIUMFLUORID
UND DEREN KOMBINATION AUF DEN ZELLZYKLUS
UND DIE RATE CHROMOSOMALER ABERRATIONEN
IN MENSCHLICHEN LYMPHOZYTENKULTUREN
IN VITRO

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von
Dipl.-Biol. Renate Slacik-Erben
aus Würzburg/Bayern

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533901_0009

WIRKUNG VON TRENIMON, NATRIUMFLUORID
UND DEREN KOMBINATION AUF DEN ZELLZYKLUS
UND DIE RATE CHROMOSOMALER ABERRATIONEN
IN MENSCHLICHEN LYMPHOZYTENKULTUREN
IN V I T R O

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Dipl.-Biol. Renate Slacik-Erben
aus Würzburg/Bayern



Erster Referent:

Prof.Dr. G. Obe

Zweiter Referent:

Prof.Dr. H.-J. Belitz

Tag der Promotion:

12.3.1976

I N H A L T

I. EINLEITUNG	4
II. MATERIAL UND METHODE	14
III. ERGEBNISSE	27
IV. DISKUSSION	75
V. ZUSAMMENFASSUNG	101
VI. LITERATUR	103
VII. TABELLEN	127

I. EINLEITUNG

Veränderungen des Erbgutes werden als Mutationen bezeichnet. Die Mutationen treten in allen Organismen spontan auf und können, wenn sie in den Keimzellen entstehen, auf die Nachkommen übertragen werden.

Die normalerweise niedrige spontane Mutationsrate wird unter dem Einfluß von Röntgenstrahlen (Zusammenstellungen bei CATCHESIDE, 1948; EVANS, 1962; LEA, 1955; MULLER, 1954) und chemischen Agenzien (Zusammenstellungen bei BARTHELMUSS, 1956; FISHBEIN et al., 1970; HOLLAENDER, 1971, 1973; LOVELESS, 1966; OBE et al., 1971; RIEGER und MICHAELIS, 1962; RÖHRBORN, 1965; VOGEL und RÖHRBORN, 1970; VOGEL et al., 1971) drastisch erhöht.

Zu den stärksten bekannten Mutagenen zählen die alkylierenden Substanzen (LAWLEY, 1974; LOVELESS, 1966; ROSS, 1962; WHEELER, 1962). Sie werden auch als Radiomimetika bezeichnet, weil sie die meisten Effekte ionisierender Strahlen kopieren. Die Gruppe der alkylierenden Agenzien umfaßt strukturell sehr verschiedene Verbindungen wie Schwefel- und Stickstofflöst, Epoxyde, Äthylenimine, Sulfonsäureester, Dialkyl- und Acyl-alkylnitrosamide. (vgl. RIEGER und MICHAELIS, 1967)

Alkylantien übertragen einen Alkylrest auf andere Atome oder Moleküle. Dabei wird unter physiologischen Bedingungen zunächst durch eine nukleophile Substitution erster oder zweiter Ordnung ein positiv geladenes Carbeniumion gebildet, das dann mit allen nukleophilen Gruppen im biologischen Material reagieren kann. Untersuchungen zur DNS-Alkylierung haben gezeigt, daß das N-7-Atom des Guanins am häufigsten betroffen ist (BAUTZ und FREESE, 1960; BROOKES und LAWLEY, 1961; WHEELER, 1962), während das N-1-Atom des Guanins sowie das N-3- und N-7-Atom des Adenins seltener alkyliert werden. Alkylierte Basen werden durch hydrolytische Spaltung von der Desoxyribose gelöst, worauf es zu einem Bruch in der Polynukleotidkette kommen kann.

Nach Einwirkung von alkylierenden Agenzien mit mehreren funktionellen Gruppen werden Vernetzungen innerhalb und zwischen den Polynukleotidsträngen der DNS-Doppelhelix gebildet, wobei zwei Nukleotide der gleichen (Intrastrang-Crosslink) oder verschiedener (Interstrang-Crosslink) Stränge durch neue kovalente Bindungen verknüpft werden. Interstrang-Crosslinks erschweren die Trennung der Polynukleotidketten und beeinträchtigen infolge-

dessen sowohl die Transkription als auch die Replikation des DNS-Moleküls.

Monofunktionelle Alkylantien bewirken kein Crosslinking.

Neben der Anzahl funktioneller Gruppen ist bei der mutagenen Wirkung der Radiomimetika auch die Struktur des Grundkörpers von Bedeutung (LÜERS und RÖHRBORN, 1965).

Im Unterschied zu den ionisierenden Strahlen sind die alkylierenden Agenzien durch sogenannte verzögerte Effekte (KIHLMAN, 1961) gekennzeichnet: Nach Einwirkung eines Alkylans in der G₂-Phase des Zellzyklus können Chromatidenaberrationen erst in der zweiten Mitose nach Behandlungsende nachgewiesen werden. Dieser Befund und die Tatsache, daß alkylierende Agenzien auch bei Applikation in der G₁-Phase ausschließlich Aberrationen auf chromatidaler Basis induzieren, weisen darauf hin, daß die Aberrationsentstehung nach Einwirkung alkylierender Stoffe an den Vorgang der DNS-Replikation gebunden ist.

Die Beantwortung der Frage, welche Mechanismen zu den lichtmikroskopischen Chromosomenveränderungen führen, wird erst dann möglich sein, wenn der Bau der Chromosomen eukaryoter Organismen aufgeklärt ist. Zur Lösung dieser Probleme soll die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der chemischen Mutagenese beitragen.

Es ist bekannt, daß die meisten Erbänderungen im homozygoten Zustand die Vitalität ihrer Träger herabsetzen oder als Letalfaktoren sogar zum Absterben des Individuums vor Erreichen des fortpflanzungsfähigen Alters führen. Nur wenige Neumutationen stellen eine Verbesserung für Organismen dar, die bereits optimal an ihren bestehenden Lebensraum angepaßt sind. Eine Erhöhung der spontanen Mutationsrate würde deshalb eine Population ernsthaft gefährden.

Die zunehmende Verunreinigung der Umwelt mit den verschiedenartigsten Stoffen wie Medikamenten, Kosmetika, Pflanzenschutzmitteln, Nahrungsmittelzusätzen, Autoabgasen und Verunreinigungen von Luft und Wasser führt zu verstärkter Kontamination der Organismen mit mutagenen Substanzen.

Wegen der noch unzureichenden Kenntnisse über mögliche mutagene Wirkungen vieler derartiger Stoffe ist eine genetische Gefährdung des Menschen schwer zu beurteilen.

Eine besondere Schwierigkeit bei der Abschätzung genetischer Risiken besteht zudem noch darin, daß die Wirkungen chemischer Substanzen normalerweise nicht direkt am Menschen (in vivo) untersucht werden können. Dies ist nur in Ausnahmefällen möglich, wenn Probanden mit Chemotherapeutika behandelt wurden oder aus beruflichen Gründen Schadstoffen ausgesetzt sind. Untersuchungen an stark exponierten Probanden können in der Regel ausschließlich mögliche mutagene Wirkungen auf Körperzellen (Lymphozyten, Fibroblasten) erfassen.

Eine Zusammenstellung von Substanzen, die nach Kontamination in vivo Chromosomenaberrationen induzieren, geben OBE et al. (1971).

In der Regel überprüft man mögliche mutagene Aktivitäten an anderen Organismen oder in vitro (menschliche Lymphozytenkulturen) und versucht, die Ergebnisse auf den Menschen zu extrapolieren. Eine ausführliche Schilderung der Problematik bei der Auswahl geeigneter Testsysteme geben VOGEL et al. (1974).

Der Mutationsforschung kommt neben der oben genannten theoretischen (Grundlagenforschung) auch eine erhebliche praktische Bedeutung zu.

Da ein Individuum im Laufe seines Lebens jedoch mit einer Vielzahl von chemischen Stoffen in Berührung kommt, genügt es nicht, sich auf vergleichende Untersuchungen zur mutagenen Wirksamkeit einzelner Substanzen zu beschränken, sondern es müssen ihre möglicherweise vorhandenen kombinativen Aktivitäten erfaßt werden.

In einer Vielzahl von Experimenten wurden zwei verschiedene Mutagene (Röntgenstrahlen, UV-Licht, Chemomutagene oder Chemomutagene untereinander) zur Einwirkung gebracht und additive (OSTER, 1958; SCOTT, 1968) oder synergistische (OSTER, 1958; BABURINA, 1973; HOLMBERG und JONASSON, 1974; RUKMANSKI, 1973) Wirkungen bei der Aberrationsauslösung nachgewiesen.

Eine zusätzliche Schwierigkeit bei der Abschätzung eines genetischen Risikos entsteht zudem dadurch, daß auch solche Substanzen die Wirkung eines Mutagens verstärken können, die allein nicht mutagen sind. Dabei kann es sich um Stoffe handeln, die entweder die Häufigkeit induzierter Primärläsionen erhöhen oder die Reparaturvorgänge in der Zelle behindern.

Eine Hemmung von Repairprozessen kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Einerseits können die Reparaturenzyme direkt geschädigt werden wie etwa durch Coffein (RAUTH, 1967; KIHLMAN et al., 1973; ROBERTS et al., 1974; VELEMSKY et al., 1975), Chloroquin (GAUDIN et al., 1971; MICHAEL und WILLIAMS) und Naproxen (KLEIN et al., 1974), andererseits kann eine Störung des Zellmetabolismus z.B. durch Atmungshemmer dazu führen, daß zur Reparatur notwendige Metaboliten oder Energieträger wie etwa ATP nicht ausreichend zur Verfügung stehen (WOLFF und LUIPPOLD, 1955; WOLFF, 1959; BEATTY und BEATTY, 1959; MUKHERJEE und SOBELS, 1967).

Das Studium der Repairprozesse ist somit für die Mutationsforschung von überragender Bedeutung. Im Hinblick auf die potentielle Gefährdung des Menschen ist insbesondere die Bearbeitung der Frage nach Reparsystemen in den verschiedenen Stadien der Keimzellentwicklung bei Säugern wichtig.

Neben Substanzen mit Verstärkerwirkung sind eine Reihe von chemischen Stoffen bekannt, die die Häufigkeit mutagen-induzierter Chromosomenschäden im Vergleich zu Kontrollversuchen senken. Derartige Schutzstoffe wurden zunächst im Zusammenhang mit der Induktion von Strahlenschäden in vitro und in vivo nachgewiesen. Als Radioprotektoren wirken Substanzen unterschiedlichster chemischer Konstitution:

Cyanide und Nitrile; Sulfhydrylverbindungen; Amine, Aminosäuren und Peptide; Anoxie hervorrufoende Verbindungen und Chelatbildner (siehe RIEGER und MICHAELIS, 1967).

Eine umfassende Zusammenstellung der Substanzen, die in verschiedenen Testsystemen einen Schutzeffekt bei Röntgenbestrahlung ausüben, gibt GEBHART (1974).

Bisher sind die Wirkungsmechanismen bei der Schutzwirkung chemischer Verbindungen vor Strahlenschäden noch nicht voll abgeklärt. Sulfhydrylverbindungen (z.B. Cystein) können strahleninduzierte Radikale abfangen und infolgedessen das Ausmaß der Strahlenschäden verringern. Darüberhinaus wird vor allem diskutiert, ob die Schutzeffekte anderer Substanzgruppen über eine Herabsetzung der Primärläsionen, eine Aktivierung von Reparaturprozessen oder über beide Möglichkeiten zustande kommen können.

Über Substanzen, die bei der chemischen Mutationsauslösung eine Schutzwirkung zeigen, liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Die ersten Arbeiten, die über Schutzeffekte bei der Aberrationsauslösung durch Chemikalien berichten, stammen von MOUTSCHEN (1958) und AVANZI (1961). AVANZI (1961) konnte zeigen, daß kombinierte Wirkung von Cystein und Pyrrolizidinalkaloiden auf Wurzelmeristeme von *Allium cepa* zu einer Senkung alkaloid-induzierter Anaphasebrücken und Chromatidbrüche führt. Ähnliche Befunde erhielt MOUTSCHEN (1958) mit dem Mutagen Maleinsäurehydrazid und dem modifizierenden Agens Cysteamin bei *Vicia faba*. Cystein senkt Äthylenimin-induzierte Schäden bei Gerstensamen besonders stark, wenn die Behandlung mit Cystein gleichzeitig mit dem Mutagen erfolgt (KAUL und CHOUDHARY, 1972). Auch die Radioprotektoren AET (2-Aminoäthylisothiuronium-bromid-hydrobromid), Cysteamin, Crystophos und Arginin üben nach Einwirkung von Radiomimetika einen Schutzeffekt bei *Escherichia coli* aus (KLITSUNOVA, 1967). Der Tranquillizer Chlorpromazin vermag *Salmonella typhimurium* vor der mutagenen Wirkung der Acridine Proflavin, Acriflavin und Quinacrin zu schützen (TOSK, 1974). Am gleichen Objekt (*Salmonella typhimurium*) konnten COUCH und FRIEDMAN (1974) zeigen, daß Natriumnitrat die Mutationshäufigkeit bei kombinierter Einwirkung mit Dimethylnitrosamin reduziert. Eine Schutzwirkung von Thio-sulfat gegen die Toxizität von Stickstofflost wiesen FASTH und BOSORBO (1973) bei der Maus nach.

In menschlichen Lymphozytenkulturen senken Aminosäuren (L-Cystein, Cysteamin, Asparagin, Methionin, Glutaminsäure) die durch Trenimon (GEBHART, 1970, 1971, 1973; BECHER und GEBHART, 1973; STOSIEK und GEBHART, 1974), Myleran (GEBHART, 1969) und 8-Hydroxychinosulfat (GEBHART, 1968, 1971, 1973) induzierten Aberrationsraten. ARUTUNIAN und KULESHOV (1972) berichten über eine Protektorst-wirkung von Cystein bei der Auslösung von Chromosomenaberrationen nach Thiothepa. Die Frequenz Chlorambucil- und Mephalan-induzierter Chromosomenschäden wird nach Amylobarbitonbehandlung im Testsystem menschlicher Lymphozyten beträchtlich erniedrigt (STEVENSON et al., 1973). Nach kombinierter Einwirkung von 7,12-Dimethylbenzantracen und Antioxidantien (Ascorbinsäure, Hydroxytoluen, Na_2SeO_3 , DL- α -tocopherol) erzielten SHAMBERGER und Mitarbeiter (1973) eine Senkung der Bruchraten in menschlichen Lymphozyten-

kulturen bis zu 60 %.

Welche Mechanismen die oben dargestellten Schutzeffekte verursachen, ist noch weitgehend unbekannt (siehe GEBHART, 1974).

Mit genetischen Tests konnte VOGEL (1973) in Kombinationsexperimenten mit Natriumfluorid und Trenimon sowie 1-Phenyl-3,3-dimethyltriazin bei *Drosophila melanogaster* eine starke antimutagene Wirkung von NaF nachweisen. Die durch das monofunktionelle Äthylenimin A 137 induzierte Mutationsrate blieb dagegen von NaF unbeeinflusst. Da A 137 vor allem Punktmutationen induziert, während Trenimon und 1-Phenyl-3,3-dimethyltriazin überwiegend Chromosomenbrüche auslösen, schließt VOGEL (1973) aus seinen Befunden, daß NaF spezifisch die Induktion von Chromosomenbrüchen verhindert.

OBE und SLACIK-ERBEN (1973) konnten die Ergebnisse von VOGEL mit Hilfe eines cytogenetischen Testsystems bestätigen. NaF senkt in menschlichen Lymphozyten die Häufigkeiten Äthylenimin-induzierter (A 139: bifunktionell; Trenimon: trifunktionell; TEB: tetrafunktionell) Chromatidbrüche, Isochromatidbrüche und Chromatidentranslokationen, während die Raten achromatischer Läsionen nicht reduziert werden.

In dieser Arbeit soll die Wirkung von NaF auf den normalen und auf den Trenimon-veränderten Zellzyklus in Ham's-F 10-Lymphozytenkulturen untersucht werden und die Frage nach der Phase des Zellzyklus, in dem NaF die Rate chromatidaler Aberrationen verhindert, beantwortet werden.

Trenimon ist ein trifunktionelles Äthylenimin und gehört somit in die Gruppe der alkylierenden Agenzien (siehe oben). Äthylenimine werden vor allem bei der Therapie von Hämoblastosen, Retikulosen und solider Tumoren angewandt (siehe BAUER, 1963).

Die mutagene Wirkung von Trenimon wurde bei *Drosophila melanogaster* (LÜERS und RÖHRBORN, 1965) und bei der Maus (RÖHRBORN, 1965; RÖHRBORN und VOGEL, 1969) nachgewiesen. Cytogenetische Untersuchungen liegen von SCHLEIERMACHER (1966) an Meiosestadien der männlichen Maus und von SPERLING (1968) und OBE (1968) an menschlichen Lymphozyten vor.

Fluorverbindungen gewinnen in unserer Umwelt zunehmend an Bedeutung. 1970 wurde die Fluoridemission in den USA auf 120 000 Tonnen geschätzt (FLUORIDES, 1971). Das Committee on Biologic Effects on Atmospheric Pollutants hat in einer Monographie (FLUORIDES, 1971) alle bekannten Fluoridwirkungen zusammengestellt. Einen Überblick über Fluorideffekte in Zellen und Geweben in vitro gibt BERRY (1969).

Der Mensch kommt mit Fluoriden z.B. durch fluoridhaltige Zahncremes, Fluoridtabletten, fluorbehaftete Nahrungsmittel oder durch Einatmen aerosolförmiger Fluoride aus Industrieemissionen in Berührung.

Seit einigen Jahren wird, wie in den USA schon lange praktiziert, auch für die Bundesrepublik die Fluoridierung des Trinkwassers erwogen, nachdem verschiedene Untersuchungen gezeigt haben, daß Fluorzusatz zu einer Verminderung von Karies führt (siehe z.B. BRUDEVOLD, 1966; HODGE und SMITH, 1954).

Eine Trinkwasserfluoridierung ist jedoch wegen möglicher Nebenwirkungen auf die Zahnschmelze und auf einige Organe (Herz, Niere, Schilddrüse) heftig umstritten.

Besonders wichtig ist, daß Fluoride in Konzentrationen, die keine sichtbaren Auswirkungen auf die Umwelt erkennen lassen, doch in den einzelnen Gliedern der Nahrungskette Pflanze - Tier - Mensch in verschiedenen Organen erheblich angereichert werden können ("unsichtbare Immissionswirkung", BÖRTITZ, 1974). BÖRTITZ schreibt: "Insbesondere bei Fluoridimmissionen, deren Quellen viel zahlreicher sind als man bisher annahm, umfaßt die unsichtbare Immissionswirkung nicht nur inmitten, sondern auch am Rande bekannter Immissionsgebiete Areale von bisher noch unbekanntem und schwer abzugrenzendem Ausmaß".

Natriumfluorid ist hochgiftig. Die Angaben über die beim Menschen tödliche Fluoriddosis schwanken zwischen 2 und 140 mg pro kg Körpergewicht. Wiederholte Kontamination mit Fluoriden kann unter anderem Gewichtsverlust, Organschädigungen und spastische Lähmungen hervorrufen.

Die toxische Wirkung des Fluorids beruht auf einer Hemmung der Glycolyse (siehe RICHTER, 1969). Die Aktivität des Enzyms Enolase wird durch Bildung eines Fluorid-Phosphat-Magnesium-Komplexes stark vermindert (BOREI, 1945; THOMAS und ALTHER, 1966;

WISEMAN, 1970; KANAPKA und HAMILTON, 1971).

Bei der zweiten energieliefernden Reaktion der Glycolyse katalysiert Enolase die Umwandlung von 2-Phosphoglycerinsäure in Phosphoenolbrenztraubensäure. Nach Übertragung des Phosphorsäurerestes der Phosphoenolbrenztraubensäure auf Adenosindiphosphat (ADP) entsteht Adenosintriphosphat (ATP) und Brenztraubensäure.

Eine Beeinträchtigung der Enolaseaktivität kann demnach zu mangelnder ATP-Versorgung führen (ANDROSOV, 1968; ELLEGAARD und DIMITROV, 1973; FEIG et al., 1971; KANAPKA et al., 1971).

Fluoride wirken nicht nur auf die Enolase aktivitätshemmend, sondern auch auf andere Enzyme der Atmungskette wie der Succinatdehydrogenase (ANDROSOV, 1968).

HAMILTON (1969a,b) registrierte in Untersuchungen mit fluoridsensitiven und fluoridresistenten Stämmen von *Streptococcus salivarius* eine Reduktion des interzellulären Gehaltes an Glucose-6-phosphat und der Polyglucosesynthese nach NaF-Behandlung. Bei *Escherichia coli* konnten HELUNG-LARSEN und KLENOW (1969) eine Hemmung der DNS-Polymeraseaktivität durch $0,16 \text{ M}$ NaF nachweisen.

Im Gegensatz zu den meisten untersuchten Enzymen, wird die Adenylcyclase durch NaF stimuliert (BAGLIONI et al., 1972; DRUMMOND et al., 1971; KAISER et al., 1974; KORNEGAY und PENNINGTON, 1973; MENON et al., 1973; SMITH et al., 1971; SULAKHE und DHALLA, 1973; WIKSTROEM und AGREN, 1973).

Einige Autoren untersuchten die Wirkung von NaF auf die Proteinsynthese. CHANG (1970, 1973) konnte bei Getreide, HARDESTY et al. (1973), HEMMINKI (1973), KHAWAJA (1972), COLOMBO et al. (1973), BISHOP (1968) und GERAGHTY et al. (1973) konnten an Säugerzellen, SHUPPE (1970) und SAMESHIMA und IZAWA (1975) an Aszitestumorzellen und VESCO und COLOMBO (1970) an HeLa Zellen zeigen, daß NaF die Proteinsynthese behindert. NaF bewirkt dabei insbesondere eine Dissoziation der Polyribosomen und eine Veränderung der Ribosomen oder deren Untereinheiten.

Dagegen fanden CZECHOWICZ et al. (1974) keine Hemmung der Proteinsynthese durch NaF bei Zellen des Meerschweinchens.

Ein vermindertes Wachstum nach NaF-Einwirkung wiesen ALBRIGHT (1964) an Säugerzellen und CARLSON und SUTTIE (1967a,b) und DEJONG (1968) an HeLa Zellen nach.

Bei intraperitonealer oder subkutaner Injektion von NaF in trächtige Ratten wurde die Rate im Uterus abgestorbener Föten im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöht (DEVOTO et al., 1972).

Wenige Autoren untersuchten die Wirkung von NaF auf das genetische Material.

Fluorid erhöht die Rate rezessiv geschlechtsgebundener Letalfaktoren bei *Drosophila melanogaster* nur leicht (GERDES, 1971; GERDES und SMITH, 1971; MITCHELL und GERDES, 1973; VOGEL, 1973) oder überhaupt nicht (MUKHERJEE und SOBELS, 1968).

VALENTIN (1971) stellte eine Beeinflussung der Rekombinationsrate in *Drosophila* Weibchen nach NaF-Behandlung fest.

Cytogenetische Untersuchungen an Gerstensamen (JAGANNATH und BHATIA, 1974; KHALATKAR et al., 1975) und an menschlichen Lymphozyten in vitro (OBE und SLACIK-ERBEN, 1973; VOROSHILIN et al., 1973) zeigten, daß NaF keine Chromosomenschäden induziert.

Dagegen fanden BALE und HART (1973a,b) Chromosomenaberrationen bei Gerste nach NaF-Behandlung. NaF induzierte auch im Meristem der Wurzelspitzen von *Vicia faba* (HAKEEM und SHEBAB, 1970) und *Allium cepa* (MOHAMMED et al., 1966) chromosomale und chromatidale Aberrationen. NaF erhöht die unter anaeroben Bedingungen induzierte Aberrationsfrequenz in den Chromosomen der Wurzelspitzen von *Vicia faba* (MERZ, 1959). JAGIELLO und JA-SHEINLIN (1974) beobachteten Chromosomenmutationen in Oocyten von Maus, Schaf und Rind nach NaF-Behandlung in vitro.

Kombinationswirkung von NaF mit anderen Mutagenen

Vorbehandlung mit NaF und anschließende Röntgenbestrahlung führte in reifen Spermien von *Drosophila melanogaster* zu einer Erhöhung der strahleninduzierten Mutationsrate (MUKHERJEE und SOBELS, 1968). Ähnliche Ergebnisse wurden an Gerstensamen nach kombinierter Einwirkung von NaF und Röntgenstrahlen (JAGANNATH und BHATIA, 1974) oder NaF und Methylmethansulfonat (KHALATKAR et al., 1975) erzielt.

In Kombination mit Trenimon wirkt NaF bei *Drosophila* stark antimutagen (VOGEL, 1973).

OBE und SLACIK-ERBEN (1973) konnten an einem cytogenetischen Testsystem die Befunde von VOGEL (1973) bestätigen. Bei gleich-

zeitiger Einwirkung von NaF und dem bifunktionellen Äthylenimin A 139, dem trifunktionellen Äthylenimin Trenimon oder dem tetrafunktionellen Äthylenimin TEB wird die Rate Äthylenimin-induzierter Chromatidbrüche, Isochromatidbrüche und Chromatidentranslokationen gesenkt.

Im gleichen Testsystem konnte nach kombinierter Behandlung von NaF mit Äthylenimin (monofunktionell), Röntgenstrahlen und Bleomycin keine Beeinflussung der Aberrationsrate durch NaF nachgewiesen werden (BRANDT, 1975).

II. MATERIAL UND METHODE

Die Experimente wurden mit einer Mikroblutkulturmethode durchgeführt. Das Blut stammte von einer gesunden sechszwanzigjährigen Frau.

Ansetzen der Blutkulturen

Eine Lymphozytenkultur setzt sich zusammen aus:

- 0,02 ml Penicillin/Dihydrostreptomycinsulfat-Gemisch
(1 mg Dihydrostreptomycin und 100 i.E. Penicillin)
- 0,12 ml Phytohämagglutinin (Difco)
- 0,50 ml Fetal Bovine Serum (Microbiological Associates Inc.,
Bethesda Maryland)
- 4,00 ml Ham's F 10 Medium (Bio-cult Laboratories Glasgow,
Scotland)
- 0,40 ml peripheres Venenblut

Je nach Umfang des Versuches wurde ein Vielfaches dieser Menge in einem sterilen Becherglas angesetzt und anschließend auf 4 ml Monovette Spritzen No 750 von Sarstedt, Nümbrecht (Versuche A und B), 30 ml Glaskulturfläschchen (Versuche C und D) oder 10 ml Einwegzentrifugenröhrchen (Versuch E) verteilt.

Die Kulturen wurden in leichter Schräglage im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt und einmal täglich umgeschüttelt.

Radioaktive Markierung

Für die Zellzyklusuntersuchungen wurden die Kulturen jeweils 15 Minuten vor Aufarbeitung mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ (Methyl- H^3)-Thymidin (Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire England; spezifische Aktivität: 2 Ci/mmol) versetzt.

Die Kultur wurde nach der Thymidinzugabe leicht geschüttelt und 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert; dabei wurde noch einmal umgeschüttelt.

Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die Aufarbeitung. Die für das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen vorgeschriebenen Sicherheitsbestimmungen wurden dabei beachtet.

Aufarbeitung

Folgende Arbeitsgänge sind dazu erforderlich:

1. 10 Minuten zentrifugieren bei 800 Umdrehungen. Absaugen des Überstands.
2. Hypotoner Schock: Sediment mit 2 ml einer 0,075 M KCL-Lösung überschichten, gut durchpipettieren und 7 Minuten stehenlassen. 10 Minuten zentrifugieren bei 800 Umdrehungen und Überstand absaugen.
3. Zellsediment mit 2 ml eines Fixiergemisches (Methanol/Eisessig 3 : 1) versetzen, schnell durchpipettieren, zentrifugieren und Überstand absaugen.
4. Zellsediment noch einmal mit 2 ml Fixiergemisch waschen, schnell durchpipettieren, zentrifugieren und Überstand absaugen.
5. Arbeitsgang 4 noch einmal wiederholen.
6. Die so gewonnenen Lymphozyten in wenigen Tropfen Fixativ resuspendieren.
7. Auftropfen auf eisgekühlte Objektträger und lufttrocknen.

Färbung der Präparate

a) Orceinfärbung

Die Präparate der Zellzyklusexperimente wurden mit einer 2 %igen Orceinlösung (65 % Essigsäure + 2 % Orcein) 45 bis 90 Minuten, je nach Alter der Orceinlösung, gefärbt, in absolutem Alkohol gespült und an der Luft getrocknet.

b) Giemsafärbung

Die Präparate für die Auswertung der Chromatidenaberrationen wurden mit Giemsa-"Normal" (Giemsa-Stamm-Lösung und Phosphatpuffer PH 6,88, 0,0025 M im Verhältnis 1 : 10 mischen und filtrieren) 10 Minuten gefärbt, 2 mal in aqua bidest gespült und luftgetrocknet. Die Präparate wurden anschließend in Xylol überführt und in Eukitt eingebettet.

Autoradiographie

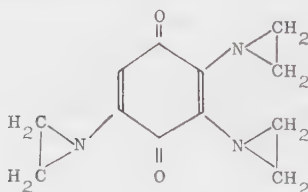
Die autoradiographischen Untersuchungen mit flüssiger Filmemulsion (KODAK Nuclear Track Emulsion, Typ NTB 3) erfordern folgende Arbeitsgänge, die alle in der Dunkelkammer bei schwachem Rotlicht

(KODAK "WRATTEN" Safelight, Series 1) erfolgten:

1. Die mit Orcein gefärbten Präparate paarweise, mit den zellfreien Flächen aneinanderliegend, in Glasküvetten einordnen und im Wasserbad bei 45°C erwärmen.
2. Emulsion aus der Vorratsflasche 1 : 1 mit aqua bidest verdünnen und 15 Minuten bei 45°C erwärmen (in der Emulsion vorhandene Luftblasen werden durch mehrmaliges Eintauchen eines sauberen Objektträgers entfernt).
3. Zwei vorgewärmte Objektträger, die mit den zellfreien Flächen aneinanderliegen, für 3 - 5 Sekunden eintauchen, anschließend trennen und senkrecht aufstellen.
4. Nach dem Antrocknen der Emulsion Präparate in Objektträgerhalter einordnen und drei Stunden in einer lichtdichten Trocknungsapparatur belüften.
5. Lichtdichtes Verpacken der Objektträger in Präparatekästen, die zur Aufnahme von Feuchtigkeit etwas CaCl_2 enthalten.
6. Exponieren der Präparate bei +4°C für ca. 14 Tage.
7. Entwickeln der Autoradiographien:
 - a) 2 Minuten entwickeln in KODAK D-19 b bei 20°C
 - b) 30 Sekunden neutralisieren in Leitungswasser
 - c) 10 Minuten fixieren in KODAK Acid Fixer bei 20°C
 - d) 20 Minuten wässern und lufttrocknen.

Chemikalien:

- a) Trenimon (2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon(1,4); Molekulargewicht: 231,26; BAYER)



Trenimon ist wasserlöslich. Die Substanz wurde stets 30 Minuten vor Zugabe in aqua bidest aufgelöst und mit Hankslösung 1 : 20 verdünnt. Die Konzentration war so berechnet, daß bei einem End-

volumen von 5 ml und 0,5 ml Substanzzugabe die Molarität in der Kultur $0,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ betrug.

Diese sowohl für die Zellzyklusanalysen als auch für die darauf aufbauenden Experimente geeignete Trenimonkonzentration wurde in Vorversuchen ermittelt.

b) Natriumfluorid (Molekulargewicht: 42)

Die NatriumfluoridstammLösung wurde unmittelbar vor Zugabe mit Hanks hergestellt. Die Endkonzentration in den Kulturen betrug nach Hinzufügen von 0,5 ml Substanz für alle Versuche 10^{-3} M .

Die Kulturen wurden nach Zugabe der Substanzen gründlich umgeschüttelt.

ZELLZYKLUSANALYSEN

Versuch A

In diesem Versuch wurde der Zellzyklus in unbehandelten Lymphozytenkulturen (Kontrolle, KO) über eine Zeitspanne von 24 bis 54 Stunden nach Kulturansatz untersucht. Im Zwei-Stunden-Rhythmus wurde jeweils eine Spritzenkultur mit ^3H -Thymidin versetzt und 15 Minuten nach Zugabe aufgearbeitet.

Um den für die Aufarbeitungen benötigten Zeitaufwand von über 30 Stunden (24 bis 54 Stunden) zu reduzieren, wurden für den Versuch zwei Ansätze ((1), (2)) zeitlich so verschoben, daß die Proben für 24 Stunden (26 Stunden, ... 38 Stunden) und für 40 Stunden (42, ... 54 Stunden) gleichzeitig aufgearbeitet werden konnten.

Jeder Ansatz bestand aus 8 Spritzen mit jeweils 2 ml Kulturgemisch. Das Blut wurde vor dem ersten Ansatz aus der Vene entnommen und bis zum zweiten Ansatz im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Aufarbeitung erfolgte in den für die Kultivierung benutzten Sarstedt-Einwegspritzen, die auch als Zentrifugenröhrchen geeignet sind. Sie wurden am Ende des Versuches als radioaktiver Abfall verworfen.

Pro Spritzenkultur wurden zwei Präparate hergestellt.

Das Zeitschema auf Seite 23 soll den Versuchsablauf noch einmal übersichtlich darstellen.

Versuch B

In diesem Versuch wurde der Zellzyklus bei Natriumfluorid-Dauerbehandlung (0 bis 54 Stunden) untersucht.

Die NaF-Endkonzentration im Kulturgemisch betrug 10^{-3} M.

Für diesen Versuch gilt das gleiche Zeitschema wie für das Kontrollexperiment (Versuch A); es ist auf Seite 23 dargestellt.

Beide Versuche wurden zu einem anderen Termin noch einmal wiederholt, so daß für Versuch A und B jeweils zwei Serien (a und b) vorliegen.

Versuch C

In diesem Experiment wurde der Zellzyklus nach einer 5-stündigen Trenimonbehandlung während der G_1 -Phase (15. - 20. Stunde nach Kulturbeginn) über eine Zeitspanne von 23 bis 74 Stunden analysiert. Vier zeitlich verschobene Ansätze ((1), (2), (3), (4)) ermöglichten eine stündliche Erfassung der $^3\text{HTdR}$ -Einbauraten und der Mitoseindizes über einen Zeitraum von 51 Stunden, obwohl an zwei aufeinanderfolgenden Tagen nur im Zwei-Stunden-Rhythmus aufgearbeitet wurde.

Das für den Versuch benötigte Blut wurde vor dem 1. Ansatztermin aus der Vene entnommen und bis zum 4. Ansatz im Kühlschrank aufbewahrt.

Jeder Ansatz bestand aus zwei Kulturen zu 13,5 ml und zwei Trenimon-freien Austauschkulturen zu 15 ml (Serie a und b).

Nach 15 Stunden wurden die Kulturen mit jeweils 1,5 ml vorgewärmter Trenimonstammlösung versetzt und vorsichtig umgeschüttelt (Trenimonendkonzentration: $0,5 \times 10^{-6}$ M).

15 Minuten vor Behandlungsende wurden die Kulturen bei 800 Umdrehungen und 37°C in einer Thermozertrifuge zentrifugiert, das Trenimonmedium abgesaugt, die Zellen in erwärmtem Hanks resuspendiert, noch einmal zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Trenimon-behandelten Lymphozyten wurden mit den Austauschmedien weiter kultiviert. Diese Arbeitgänge erfolgten unter sterilen Bedingungen.

30 Minuten vor Aufarbeitung wurden aus jedem Kulturfläschchen jeweils 1 ml Kulturgemisch in warmen Einwegspritzen aufgezogen und bis zur $^3\text{HTdR}$ -Zugabe in den Brutschrank zurückgestellt.

Die radioaktive Markierung und die Aufarbeitung erfolgte wie oben

beschrieben.

Bei diesem Versuch wurden pro Kurvenpunkt zwei Parallelkulturen (Serie a und b) aufgearbeitet.

Die Schemata auf Seite 24 und 25 sollen den Versuchsablauf übersichtlich darstellen.

Versuch D

In diesem Experiment sollte untersucht werden, welchen Einfluß NaF auf den durch Trenimon veränderten Zellzyklus hat.

Diese Versuchsserien wurden bis auf die NaF-Behandlung wie Versuch C durchgeführt (siehe Schemata auf Seite 24 und 25).

Alle Kulturen und Austauschkulturen enthielten NaF von Kulturbeginn an in einer Endkonzentration von 10^{-3} M.

Der Mediumwechsel nach Ende der Trenimonbehandlung erfolgte mit NaF-Austauschmedium, so daß NaF bis zur Aufarbeitung in den Kulturen vorhanden war.

Auswertung der Zellzyklusexperimente

Zur Bestimmung der Prozentsätze radioaktiv markierter Interphasekerne wurden pro Kurvenpunkt und Versuchsserie (a und b) 200 bis 1 000 transformierte Zellkerne ausgewertet.

Als markiert galten hierbei nur Interphasekerne mit mehr als 10 Silberkörnern.

Für jeden Kurvenpunkt wurde die mittlere Abweichung des Mittelwertes (m) bestimmt.

Die Mitoseindices wurden nach Auszählung von jeweils 1 000 Zellkernen errechnet.

Die Mikrokernhäufigkeiten wurden für Serie b des Trenimonversuchs (Versuch C) und für beide Serien (a und b) des Kombinationsexperiments (Versuch D) nach Auswertung von 400 bis 1 300 Zellkernen bestimmt.

Versuch E

Experimente zum Einfluß von NaF auf die Rate Trenimon-induzierter Chromatidenaberrationen

Für diese Versuche wurde das Kulturgemisch in Einwegzentrifugenröhrchen verteilt. Das Endvolumen jeder Kultur betrug nach Trenimon- und NaF-Zugabe 5 ml.

Die Trenimonbehandlung erfolgte in allen Versuchsserien, wie für die Zellzyklusanalysen (Versuch C und D) beschrieben, 15 bis 20 Stunden nach Kulturbeginn.

Die NaF-Einwirkung wurde bei konstanter Endkonzentration von 10^{-3} M zeitlich variiert.

Neun Stunden vor Aufarbeitung erhielt jede Kultur 0,2 ml Colcemid (Ciba, Konzentration: 0,2 µg/ml).

Von jeder Versuchsserie wurden jeweils zwei Kulturen nach 65 (I-Kulturen) und 74 (II-Kulturen) Stunden aufgearbeitet.

Die Aufarbeitung erfolgte in spitz zulaufenden Glaszentrifugenröhrchen.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

Nullkontrolle (K)

Die unbehandelten Kulturen wurden 53 Stunden nach Kulturansatz und 5-stündiger Colcemideinwirkung (53 Stunden - 5 Stunden Colcemid) aufgearbeitet, um die spontane Aberrationsrate in der ersten Mitose nach PHA-Zugabe zu erfassen. Bei Aufarbeitung nach 65 bzw. 74 Stunden würde man einen hohen Prozentsatz an zweiten Mitosen erhalten.

(2 Kulturen, 200 Metaphaseplatten)

NaF-Kontrolle (F)

Hier erfolgte eine NaF-Dauerbehandlung mit einer Endkonzentration von 10^{-3} M. Die Kulturen wurden wie die Nullkontrolle nach 53 Stunden Kulturdauer aufgearbeitet. Fünf Stunden vor Abbruch der Kulturen wurde Colcemid hinzugefügt (53 Stunden - 5 Stunden Colcemid).

(3 Kulturen, 300 Metaphaseplatten)

Trenimonkontrolle (Treko)

Die Kulturen wurden, wie bei Versuch C beschrieben, von 15 bis 20 Stunden nach Kulturbeginn mit Trenimon ($0,5 \times 10^{-6}$ M Endkonzentration) behandelt. Die Aufarbeitung erfolgte 65 (I) und 74 (II) Stunden nach Kulturbeginn.

(zwei I-Kulturen, 200 Metaphaseplatten; zwei II-Kulturen, 200 Metaphaseplatten)

Versuch 1 (NaF₁₅ - 20)

Die NaF- und Trenimonbehandlung erfolgte gleichzeitig (15. - 20. Stunde). Nach der Einwirkungszeit wurden die Trenimon-NaF-Medien abzentrifugiert, die Lymphozyten in Hankslösung gewaschen und mit Austauschmedien weiterkultiviert.

(zwei I-Kulturen, 200 Metaphaseplatten; zwei II-Kulturen, 200 Metaphaseplatten)

Versuch 2 (NaF₀ - 15)

In diesem Versuch wurden die Lymphozyten mit NaF vorbehandelt. Vor Trenimonzugabe wurden die NaF-Medien abzentrifugiert, die Lymphozyten in Austauschmedium resuspendiert und mit 0,5 ml Trenimonstammlösung versetzt. Nach Ende der Trenimonbehandlung erfolgte wieder Mediumwechsel (siehe Trenimonkontrolle).

(zwei I-Kulturen, 200 Metaphaseplatten; zwei II-Kulturen, 200 Metaphaseplatten)

Versuch 3 (NaF₀ - 20)

Hier blieb das NaF bis zum Ende der Trenimonbehandlung in den Kulturen. Weiterbehandlung wie bei der Trenimonkontrolle.

(zwei I-Kulturen, 200 Metaphaseplatten; zwei II-Kulturen, 200 Metaphaseplatten)

Versuch 4 (NaF₂₀ - 65; NaF₂₀ - 74)

In diesem Versuch wurden die Trenimon-behandelten Lymphozyten in NaF-Austauschmedien resuspendiert und weiterkultiviert. NaF war somit von 20 bis 65 und von 20 bis 74 Stunden in den Kulturen vorhanden.

(zwei I-Kulturen, 200 Metaphaseplatten; zwei II-Kulturen, 200 Metaphaseplatten)

Versuch 5 (NaF₁₅ - 65; NaF₁₅ - 74)

NaF- und Trenimonapplikation erfolgten zum gleichen Zeitpunkt. Nach abgeschlossener Trenimon-Einwirkungsdauer wurden die Zellen

in NaF-Austauschmedien resuspendiert, so daß die NaF-Behandlung bis zum Kulturabbruch fortgesetzt wurde.

(zwei I-Kulturen, 200 Metaphaseplatten; zwei II-Kulturen, 200 Metaphaseplatten)

Versuch 6 (NaF_O_-_65; NaF_O_-_74)

Hier wurde eine NaF-Dauerbehandlung durchgeführt. Der Mediumwechsel nach Ende der Trenimoneinwirkung erfolgte mit NaF-Austauschmedium.

(zwei I-Kulturen, 200 Metaphaseplatten; drei II-Kulturen, 300 Metaphaseplatten)

Das Schema auf Seite 26 soll die NaF-Zeitvariationsversuche noch einmal übersichtlich darstellen.

Auswertung der NaF-Zeitvariationsversuche

Die Chromosomenpräparate wurden mit einem Leitz-Mikroskop (Öl-immersionsobjektiv 100 fach, Okulare 10 fach) ausgewertet.

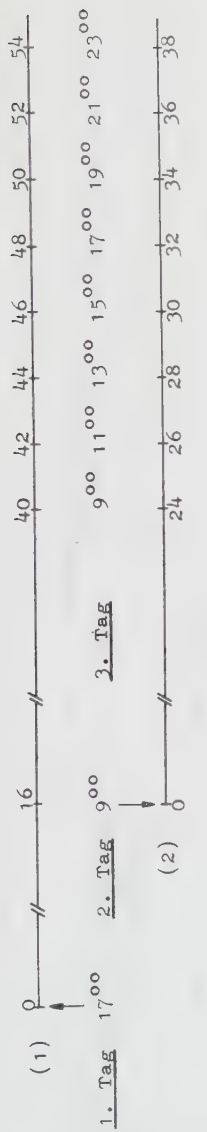
Es wurden nur vollständige Metaphaseplatten erfaßt.

Es wurden insgesamt 3 400 Metaphaseplatten ausgewertet.

Die Unterschiede in den Aberrationshäufigkeiten von Trenimonkontrolle und den einzelnen Kombinationsexperimenten wurden mit dem Vierfelder- χ^2 -Test geprüft.

Darüberhinaus wurde für diese Experimente eine zweifache Varianzanalyse mit Rangzahlen (Friedman-Test), und der multiple Vergleich von Wilcoxon und Wilcoxon durchgeführt.

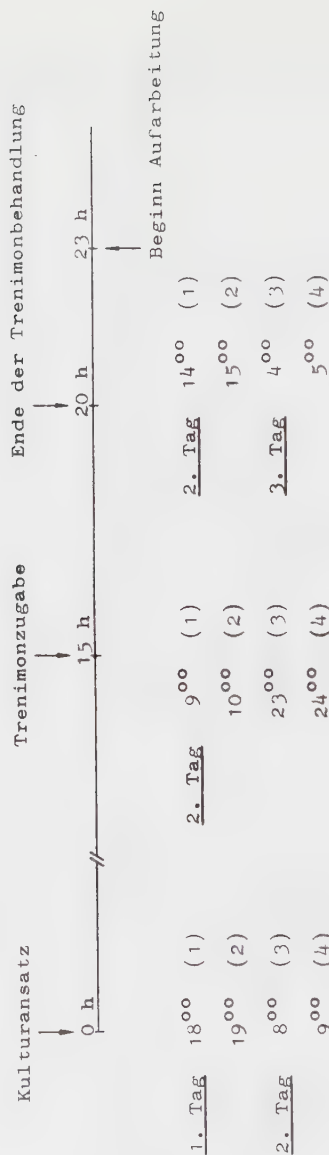
Zeitschema für Versuch A und B:



1. Tag 17⁰⁰ Ansatz (1) (8 Spritzen zu 2 ml)
2. Tag 9⁰⁰ Ansatz (2) (8 Spritzen zu 2 ml)
3. Tag 9⁰⁰ - 23⁰⁰ Aufarbeitungen im 2-Stunden-Rhythmus

15 Minuten vor jeder Aufarbeitung wurden die Kulturen mit 2 μ C (Methyl-³H)-Thymidin (2 Tropfen mit Kanüle No 1) versetzt (siehe Material und Methode Seite 14)

Zeitschema für Trenimonbehandlung (Versuch C und D):



am 3. und 4. Tag erfolgen die Aufarbeitungen

Kulturansatz:

pro Termin 2 x 13,50 ml

2 x 15,00 ml für Austauschkulturen

Zeitschema für Versuch C und D:

(Trenimonbehandlung siehe Schema auf Seite 24)

1. Tag
18⁰⁰ (1)

0 1 14 // 38 40 42 44 46 48 50

(2) 0 13 // 37 39 41 43 45 47 49

19⁰⁰

Std.	Kultur-	dauer
1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9
10	10	10
11	11	11
12	12	12
13	13	13
14	14	14
15	15	15
16	16	16
17	17	17
18	18	18
19	19	19
20	20	20
21	21	21
22	22	22
23	23	23
24	24	24
25	25	25
26	26	26
27	27	27
28	28	28
29	29	29
30	30	30
31	31	31
32	32	32
33	33	33
34	34	34
35	35	35
36	36	36
37	37	37
38	38	38
39	39	39
40	40	40
41	41	41
42	42	42
43	43	43
44	44	44
45	45	45
46	46	46
47	47	47
48	48	48
49	49	49
50	50	50
51	51	51
52	52	52
53	53	53
54	54	54
55	55	55
56	56	56
57	57	57
58	58	58
59	59	59
60	60	60
61	61	61
62	62	62
63	63	63
64	64	64
65	65	65
66	66	66
67	67	67
68	68	68
69	69	69
70	70	70
71	71	71
72	72	72
73	73	73
74	74	74
75	75	75
76	76	76
77	77	77
78	78	78
79	79	79
80	80	80
81	81	81
82	82	82
83	83	83
84	84	84
85	85	85
86	86	86
87	87	87
88	88	88
89	89	89
90	90	90
91	91	91
92	92	92
93	93	93
94	94	94
95	95	95
96	96	96
97	97	97
98	98	98
99	99	99
100	100	100

	8 ⁰⁰	10 ⁰⁰	12 ⁰⁰	14 ⁰⁰	16 ⁰⁰	18 ⁰⁰	20 ⁰⁰
2. Tag	6	24	26	28	30	32	34
3. Tag	6	23	25	27	29	31	33

Std.	Kultur-	dauer
1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9
10	10	10
11	11	11
12	12	12
13	13	13
14	14	14
15	15	15
16	16	16
17	17	17
18	18	18
19	19	19
20	20	20
21	21	21
22	22	22
23	23	23
24	24	24
25	25	25
26	26	26
27	27	27
28	28	28
29	29	29
30	30	30
31	31	31
32	32	32
33	33	33
34	34	34
35	35	35
36	36	36
37	37	37
38	38	38
39	39	39
40	40	40
41	41	41
42	42	42
43	43	43
44	44	44
45	45	45
46	46	46
47	47	47
48	48	48
49	49	49
50	50	50
51	51	51
52	52	52
53	53	53
54	54	54
55	55	55
56	56	56
57	57	57
58	58	58
59	59	59
60	60	60
61	61	61
62	62	62
63	63	63
64	64	64
65	65	65
66	66	66
67	67	67
68	68	68
69	69	69
70	70	70
71	71	71
72	72	72
73	73	73
74	74	74
75	75	75
76	76	76
77	77	77
78	78	78
79	79	79
80	80	80
81	81	81
82	82	82
83	83	83
84	84	84
85	85	85
86	86	86
87	87	87
88	88	88
89	89	89
90	90	90
91	91	91
92	92	92
93	93	93
94	94	94
95	95	95
96	96	96
97	97	97
98	98	98
99	99	99
100	100	100

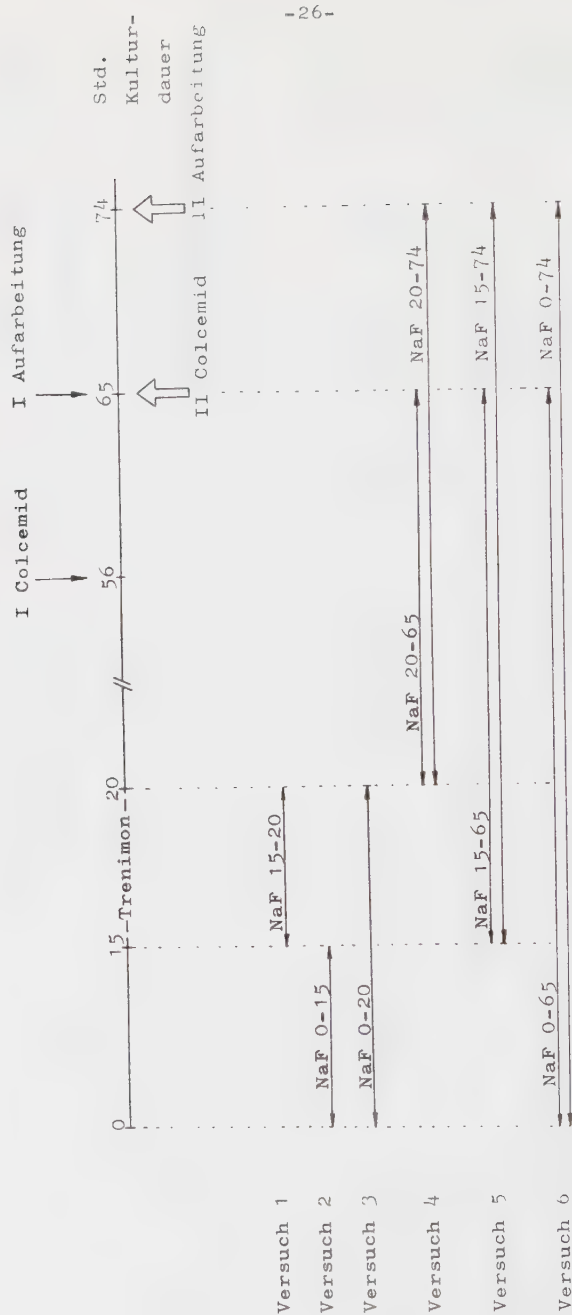
(1)	62	64	66	68	70	72	74
(2)	61	63	65	67	69	71	73

Std.	Kultur-	dauer
1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9
10	10	10
11	11	11
12	12	12
13	13	13
14	14	14
15	15	15
16	16	16
17	17	17
18	18	18
19	19	19
20	20	20
21	21	21
22	22	22
23	23	23
24	24	24
25	25	25
26	26	26
27	27	27
28	28	28
29	29	29
30	30	30
31	31	31
32	32	32
33	33	33
34	34	34
35	35	35
36	36	36
37	37	37
38	38	38
39	39	39
40	40	40
41	41	41
42	42	42
43	43	43
44	44	44
45	45	45
46	46	46
47	47	47
48	48	48
49	49	49
50	50	50
51	51	51
52	52	52
53	53	53
54	54	54
55	55	55
56	56	56
57	57	57
58	58	58
59	59	59
60	60	60
61	61	61
62	62	62
63	63	63
64	64	64
65	65	65
66	66	66
67	67	67
68	68	68
69	69	69
70	70	70
71	71	71
72	72	72
73	73	73
74	74	74
75	75	75
76	76	76
77	77	77
78	78	78
79	79	79
80	80	80
81	81	81
82	82	82
83	83	83
84	84	84
85	85	85
86	86	86
87	87	87
88	88	88
89	89	89
90	90	90
91	91	91
92	92	92
93	93	93
94	94	94
95	95	95
96	96	96
97	97	97
98	98	98
99	99	99
100	100	100

(3)	//	8 ⁰⁰	10 ⁰⁰	12 ⁰⁰	14 ⁰⁰	16 ⁰⁰	18 ⁰⁰	20 ⁰⁰
(4)	//			51	53	55	57	59

Std.
Kultur-
dauer

Schema zu den NaF-Zeitvariationsversuchen:



III. ERGEBNISSE

ZELLZYKLUSANALYSEN

Bei der Bestimmung der Prozentsätze radioaktiv markierter Interphasekerne wurden nur solche mit aufgelockertem Chromatin berücksichtigt. Dabei wurden Zellkerne mit mehr als zehn Silberkörnern als markiert gewertet (Abb. 1 und 2).

Trägt man die Prozentsätze markierter Interphasekerne über der Kulturdauer auf, erhält man eine Kurve, die den Verlauf der DNS-Synthese anzeigt.

Die Mitoseindices geben Aufschluß über die Zellteilungsaktivität in der Kultur (Abb. 2).

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von NaF auf den normalen und Trenimon-verzögerten Zellzyklus in einer Ham's-F 10-Lymphozytenkultur untersucht.

Versuch A (Kontrolle)

Die DNS-Synthese beginnt 28 Stunden nach Kulturansatz und verläuft in der Zeitspanne bis 50 Stunden biphasisch. Die beiden Maxima liegen in der a-Serie bei 38 (47,63 % markierte Interphasen) und im Bereich zwischen 44 (43,51 %) und 46 (44,63 %) Stunden Kulturdauer. In der b-Serie treten die Maxima bei 36 (38,84 %) und 42 (46,83 %) Stunden auf.

Faßt man Versuchsserie a und b zusammen, ergeben sich Maxima bei 36 (41,74 %) und 44 (43,26 %) Stunden Kulturdauer.

Die ersten Mitosen erscheinen in der a-Serie 36 Stunden, in Serie b 32 Stunden nach Kulturbeginn. Die Mitosekurve weist wie die Kurve der DNS-Synthese zwei Maxima auf, und zwar in beiden Kontrollserien bei 42 und 48 Stunden Kulturdauer. Die Mitoseindices betragen für das erste Maximum 1,0 und 1,4 %, für das zweite Maximum 2,1 und 1,8 %.

Ein Vergleich beider Kontrollserien ergibt, daß DNS-Synthesebeginn, Mitosemaxima und die ^3H -Thymidineinbauraten gut übereinstimmen, während die DNS-Synthesemaxima um etwa zwei Stunden verschoben sind.

Diese Unterschiede sind mit einer normalen Schwankung zu erklären,

da sich eine systematische Verschiebung der DNS-Synthese mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf die Mitosemaxima auswirken würde, was hier aber nicht beobachtet wurde.

Die Häufigkeiten markierter Interphasekerne mit den dazugehörigen mittleren Abweichungen der Mittelwerte und die Mitoseindices für die Zeitspanne von 24 bis 54 Stunden Kulturdauer sind für Serie a in Tabelle 1, für Serie b in Tabelle 2 und Serie a+b in Tabelle 3 zusammengestellt. In Abbildung 14 wurden DNS-Synthesemuster und Mitoseindices graphisch dargestellt.

Versuch B (NaF)

Bei NaF-Dauerbehandlung beginnt die DNS-Synthese wie in der Kontrolle nach 28 Stunden Kulturdauer, steigt aber dann kontinuierlich an bis zu einem ersten Maximum bei 38 Stunden (Serie a), mit einer $^3\text{HTdR}$ -Einbaurate von 54 % und bei 38 bis 40 Stunden (Serie b) mit 46 bzw. 46,67 % markierten Interphasekernen, fällt dann wieder ab auf 39,75 bzw. 37,33 %, und erreicht in Serie a bei 46 Stunden (53,13 % markierte Interphasen), in Serie b bei 44 bis 46 Stunden (43,00 und 43,15 % markierte Interphasekerne) ein zweites Maximum.

Erste Mitosen wurden 38 (Serie a) bzw. 34 (Serie b) Stunden nach Stimulierung registriert. Das erste Maximum liegt in beiden Serien bei 42 Stunden mit Mitoseindices von 1,9 (Serie a) und 1,4 % (Serie b), das zweite Maximum bei 48 (Serie a) und 46 (Serie b) Stunden mit Mitoseindices von jeweils 1,9 %.

Faßt man die Ergebnisse aus beiden Parallelversuchen zusammen, ergeben sich für die DNS-Synthese Maxima bei 38 (50 % markierte Interphasen) und 46 (48,14 % markierte Interphasen) Stunden, für die Mitoseindices liegen die Maxima bei 42 (1,65 %) und 48 (1,7 %) Stunden Kulturdauer.

Ein Vergleich beider NaF-Serien zeigt, daß sich bei den DNS-Synthesemaxima nur geringe Schwankungen ergaben: Das zweite Maximum in Serie b liegt etwa eine Stunde vor dem Maximum aus Serie a. Beim zweiten Maximum der Mitosekurve trat eine Verschiebung um etwa zwei Stunden auf. Es erscheint in Serie a bei 48, in Serie b bei 46 Stunden Kulturdauer.

Die Ergebnisse des NaF-Versuches und die mittleren Abweichungen der Mittelwerte für die Prozentsätze markierter Interphasekerne sind in Tabelle 4 für Serie a, in Tabelle 5 für b und Tabelle 6

für a+b aufgeführt. Abbildung 15 gibt die DNS-Synthese- und Mitosekurven wieder.

Mit diesem Experiment sollte untersucht werden, ob eine NaF-Behandlung den Zellzyklus in Lymphozytenkulturen beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß NaF auf DNS-Synthese und mitotische Aktivität weder hemmend noch aktivierend wirkt. Die aufgetretenen Unterschiede zwischen Kontroll- und NaF-Versuch liegen im Bereich der Schwankung zwischen den Parallelkulturen beider Experimente.

Eine Gegenüberstellung der DNS-Synthese- und Mitosemaxima aus Kontroll- und NaF-Serien gibt Tabelle 7. Abbildung 16 zeigt die gemittelten Kurven beider Experimente.

Versuch C (Trenimon)

Die Lymphozytenkulturen wurden in der G₁-Phase des Zellzyklus mit Trenimon behandelt und zwar von 15 bis 20 Stunden nach Kulturbeginn. Die Endkonzentration in den Kulturen betrug $0,5 \times 10^{-6}$ M (siehe Material und Methode).

Die DNS-Synthese beginnt 26 Stunden nach Kulturansatz, fällt drei Stunden später wieder auf den Nullpunkt zurück, steigt erneut an und erreicht in dem Bereich von 33 bis 36 Stunden ein erstes Maximum, mit Einbauraten von etwa 15 bis 20 %.

In der Zeitspanne von 37 bis 50 Stunden Kulturdauer wird kaum tritiummarkiertes Thymidin in die DNS der Lymphozyten eingebaut. Ausnahmen bilden die 40, 45 und 49 Stunden-Stichproben der Serie a, mit Häufigkeiten markierter Interphasekerne von 8,67, 5,50 und 17,83 %. Dagegen bleibt die Markierungsfrequenz in der b-Serie im Bereich von 40 bis 49 Stunden immer unter 3,66 %.

Nach 51 Stunden Kulturdauer erhöhen sich die Prozentsätze der markierten Interphasekerne auf 20,5 (Serie a) und 21,5 (Serie b) %. Bis 67 Stunden verläuft die DNS-Synthesekurve mit einer durchschnittlichen Einbaurrate von 23,5 %.

Einschnitte sind in beiden Parallelserien bei 56 und 62 Stunden zu beobachten. Die Häufigkeiten markierter Interphasekerne betragen hier nur 15,33 bzw. 17,16 % und 14,83 bzw. 10,16 %.

Von 68 Stunden bis Kulturabbruch nehmen die ³HTdR-Einbauraten wieder etwas ab. In diesem Zeitintervall wurden durchschnittlich

nur noch 19,5 % markierte Interphasekerne gefunden.

Die ersten Mitosen wurden 54 (Serie a) und 55 (Serie b) Stunden nach Kulturbeginn beobachtet. Die Mitoseindices lassen keine Schlüsse auf eine besondere Rhythmik im Auftreten von Mitosen zu. Sie liegen im Bereich von 54 bis 69 Stunden zwischen 0,1 und 0,5 %, von 70 bis 74 Stunden wurden Mitoseindices bis zu 1,0 % ermittelt.

Vergleicht man die Ergebnisse des Trenimonexperimentes mit dem Kontrollversuch, zeigt sich, daß sowohl die DNS-Synthese wie auch das Auftreten von Mitosen erheblich verzögert werden.

In dem Bereich von 36 bis 50 Stunden, in dem in der Kontrolle (KO) Häufigkeiten markierter Interphasekerne von etwa 50 % registriert wurden, findet nach Trenimonbehandlung kaum $^3\text{H}\text{TdR}$ -Einbau statt. Auch nach dieser Verzögerungsphase werden nur maximale Einbauraten von 28 % erreicht, während in der Kontrolle Häufigkeiten markierter Interphasekerne bis zu 60 % auftreten.

Die ersten Mitosen erscheinen 20 Stunden später als im Kontrollversuch. Nach 52 Stunden Kulturdauer, dem normalen Aufarbeitungstermin für eine Ham's-F 10-Kultur, befand sich im Trenimonexperiment noch keine Zelle in Teilung. Im untersuchten Zeitraum lagen die Mitoseindices nicht höher als 1 %, in der Kontrolle (KO) wurden dagegen Mitoseraten von über 2 % erreicht.

Die Ergebnisse beider Trenimonexperimente sind in Tabelle 8 (Serie a) und 9 (Serie b) aufgeführt und in Abbildung 17 graphisch dargestellt.

Für die Trenimonserie b wurden die Mikrokernraten bestimmt (Tab. 12). Sie liegen zwischen 0,15 und 1 %. Da auch kein Ansteigen der Mikronuklei von 23 bis 73 Stunden zu erkennen ist, dürften die gefundenen Mikrokernraten auf dem Kontrollniveau liegen. Die Daten über die Mikronukleihäufigkeiten geben keinen Aufschluß darüber, ob möglicherweise Zellen in der Kultur vorhanden waren, die schon den ersten Zellzyklus durchlaufen hatten.

Versuch D (Kombination NaF und Trenimon)

In diesem Experiment wurden die Kulturen mit Trenimon (5 Stunden in G₁) und NaF (von 0 bis 74 Stunden) behandelt (siehe Material und Methode).

Der Einbau von ³HTdR beginnt bei 29 Stunden Kulturdauer und nimmt im weiteren Verlauf kontinuierlich zu. Bei 56 Stunden sind 36,66 % (in Serie a) und 34,83 % (in Serie b) der Interphasekerne radioaktiv markiert. Nach einem Absinken der Markierungsfrequenz bei 57 und 58 Stunden auf 22,33 und 27,5 % (in Serie a) bzw. 24,66 und 23,5 % (in Serie b) erfolgt von 59 bis 74 Stunden wieder ein Ansteigen der Prozentsätze markierter Interphasekerne. Die durchschnittlichen Einbauraten betragen in diesem Zeitraum nur noch 28 %. Eine Ausnahme bildet in der Serie a die Markierungsfrequenz der 59-Stunden-Stichprobe mit 40,66 %.

Erste Mitosen wurden in der a-Serie nach 47 Stunden, in der b-Serie nach 55 Stunden Kulturdauer beobachtet. Bis Kulturabbruch wurden zu allen Aufarbeitungsterminen Mitosen registriert; die Mitoseindices liegen im Bereich von 0,1 bis 0,9 %. Der höchste Wert von 0,9 % wurde nach 74 Stunden Kulturdauer in der b-Serie gefunden.

Die DNS-Synthese- und Mitosekurven der beiden Parallelversuche stimmen sehr gut überein. Die Häufigkeiten markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen der Mittelwerte und die Mitoseindices sind in Tabelle 10 (Serie a) und 11 (Serie b) aufgeführt. Eine graphische Darstellung der Versuchsergebnisse gibt Abbildung 18.

Die Mikrokernraten schwanken in der Zeitspanne von 23 bis 74 Stunden zwischen 0 und 0,83 % (siehe Tab. 13).

Eine Gegenüberstellung der Experimente C und D zeigt, daß NaF die Trenimon-verzögerte DNS-Synthese beeinflusst. Die DNS-Synthese setzt in beiden Versuchen zum gleichen Zeitpunkt ein, fällt dann aber in Gegenwart von NaF nicht wieder auf den Nullpunkt zurück, sondern nimmt kontinuierlich zu. In dem Bereich von 36 bis 50 Stunden, in dem im Trenimonversuch kaum ³HTdR-Einbau stattfindet, wurden im Kombinationsexperiment Häufigkeiten markierter Inter-

phasekerne von 12 bis 33 % erreicht.

Nach Trenimoneinwirkung wurden nur maximale Einbauraten von 28 % gefunden, während nach kombinierter Behandlung bis zu 40 % markierte Kerne auftraten.

Im Verlauf der Mitosekurven kann kein Unterschied zwischen den beiden Experimenten abgelesen werden. Es wurden zwar in der b-Serie des Kombinationsversuchs schon nach 47, 51 und 53 Stunden Kulturdauer Mitosen registriert, in der a-Serie treten die Mitosen jedoch zum gleichen Zeitpunkt auf wie im Trenimonexperiment. Auch die Mitoseindices liegen wie in Versuch C zwischen 0,1 und 0,9 %.

Einen Eindruck der NaF-Wirkung auf den normalen und Trenimonverzögerten Zellzyklus soll Abbildung 19 vermitteln.

EINFLUSS VON NAF AUF DIE RATE TRENIMON-INDUZIERTER CHROMATIDEN-ABERRATIONEN

Versuch E

In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluß von NaF, das zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus zur Einwirkung kam, auf die Rate Trenimon-induzierter Chromatidenaberrationen untersucht.

In allen Serien erfolgte die Trenimonbehandlung in G_1 (15.-20. Stunde) mit gleicher Konzentration ($0,5 \times 10^{-6} \text{ M}$), die NaF-Zugabe wurde variiert (siehe Material und Methode).

Alkylierende Agenzien sind normalerweise nicht in der Lage, Aberrationen auf chromosomaler Basis auszulösen. In der Regel werden ausschließlich Chromatidenaberrationen induziert. Trotzdem wurde in unseren Experimenten ein geringer Prozentsatz Chromosomenaberrationen gefunden.

Zunächst sollen kurz die in die Auswertung einbezogenen Aberrationstypen charakterisiert werden:

Aberrationstypen:

1. Achromatische Läsionen (AL)

Die achromatischen Läsionen sind Färbelücken in der Längsstruktur der Chromosomen. Bei der Chromatidentrennung in der Anaphase entsteht kein Verlust an genetischem Material, was gegen eine echte Diskontinuität der Chromatidenstruktur spricht.

Eine Aberration wurde nur dann als achromatische Läsion gewertet, wenn die Chromatide bis auf die Färbelücke intakt war, wobei die Länge der Unterbrechung keine Rolle spielte (Abb. 4, 5, 6, 7).

2. Chromatidbrüche (B')

Die Chromatidbrüche stellen im Gegensatz zu den achromatischen Läsionen echte Diskontinuitäten dar. Als Bruch wurde eine Aberration nur dann klassifiziert, wenn eine deutliche Verlagerung des Bruchstückes zu erkennen war (Abb. 5, 8, 9). Die Unterscheidung zwischen AL und B' kann in Grenzfällen schwierig sein.

3. Isochromatidbrüche (B'')

Bei Isochromatidbrüchen sind beide Schwesterchromatiden an morphologisch homologen Stellen gebrochen. Die centromerlosen Chromatidstücke können in den meisten Fällen dem Restchromosom nicht mehr zugeordnet werden. Überzählige kinetochorlose Chromosomenelemente wurden immer als B'' gewertet (Abb. 5, 10, 11).

4. Chromatidentranslokationen (RB')

Nach Induktion von Brüchen und Isochromatidbrüchen laufen in der Zelle Reparaturprozesse ab. Bei Verknüpfung nicht zusammengehöriger Bruchenden entstehen Chromatidentranslokationen. Werden bei der Verheilung die Centromeren verbunden, spricht man von asymmetrischen (Abb. 7 und 10), im anderen Fall von symmetrischen (Abb. 5, 7, 10, 12, 13) Translokationen. Beide Translokationstypen können noch in vollständig und unvollständig unterteilt werden, je nachdem, ob alle Bruchenden verheilt sind oder nicht. An Translokationsfiguren können auch mehr als zwei Chromosomen beteiligt sein.

Die Chromatidentranslokationen sind wegen ihrer charakteristischen Kreuzfiguren in den Metaphaseplatten sicher zu erkennen. Diese typische Konfiguration beruht sowohl darauf, daß die Schwesterchromatiden bis zur Anaphase weitgehend gepaart bleiben, als auch auf Aufbiegungen, wodurch die Chromatiden ihren Verlauf an der verheilten Bruchstelle um 90° ändern. Eine Translokation zwischen zwei Chromosomen nach Eintritt eines Chromatiden- und eines Isochromatidenbruches wird als Triradial (RB'B'') bezeichnet.

net (Abb. 8 und 11).

5. Chromosomenaberrationen:

a) dizentrische Chromosomen

Werden asymmetrische Translokationen in der G_1 -Phase des Zellzyklus, in der die Chromosomen funktionell einsträngig vorliegen, gebildet, entstehen dizentrische Chromosomen und azentrische Fragmente (Abb. 5).

b) Ringe

Zwei Bruchereignisse an einem Chromosom vor der DNS-Replikation führen zu einer interstitiellen Deletion. Nach Reunion der Bruchflächen entsteht daraus ein zentrischer oder azentrischer Ring, je nachdem, ob das Centromer in der Deletion enthalten war oder nicht (Abb. 4 und 11).

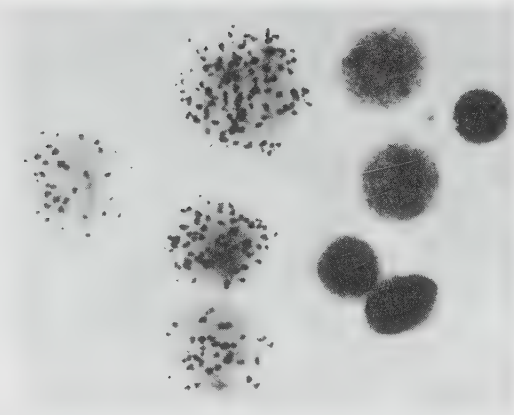


ABBILDUNG 1: Markierte und unmarkierte Interphasekerne aus Versuch D (55 Stunden Kulturdauer)

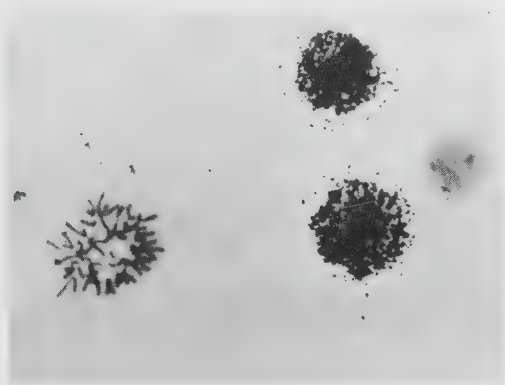


ABBILDUNG 2: Eine Metaphase neben einem unmarkierten und zwei markierten Interphasekernen aus Versuch A (54 Stunden Kulturdauer)

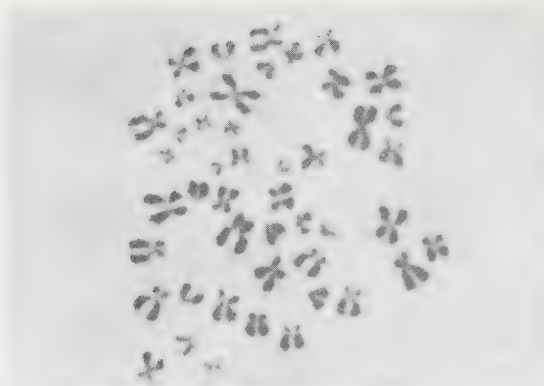


ABBILDUNG 3: Ungeschädigte Metaphaseplatte der Blutspenderin



ABBILDUNG 4: Metaphaseplatte aus der Trenimonkontrolle mit einer
achromatischen Läsion (a) und einem azentrischen
Ring (f)

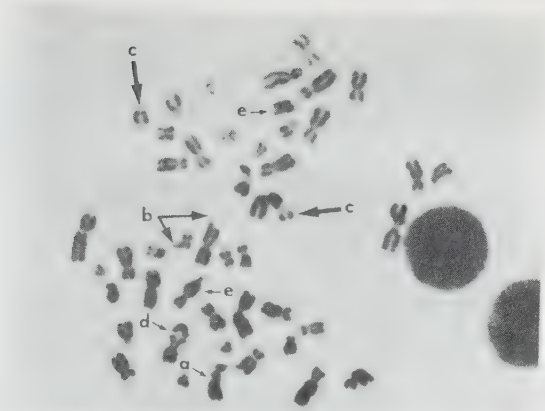


ABBILDUNG 5: Metaphaseplatte aus der Serie NaF 0-20 I mit einer achromatischen Läsion (a), zwei Chromatidbrüchen (b), zwei Isochromatidbrüchen (c), einer symmetrischen Translokation (d) und einem dizentrischen Chromosom mit Fragment (e)

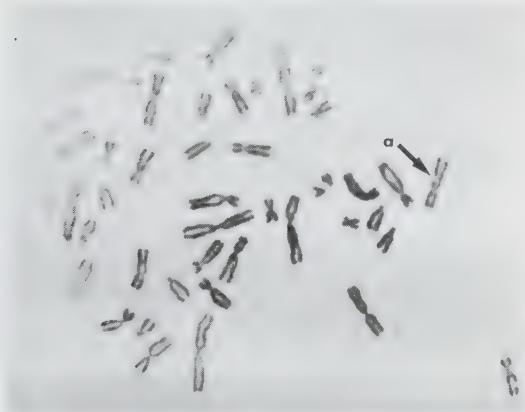


ABBILDUNG 6: Metaphaseplatte aus der Serie NaF 15-74 II mit einer achromatischen Läsion (a)



ABBILDUNG 7: Metaphaseplatte aus der Serie NaF 0-65 I mit einer achromatischen Läsion (a), einem Isochromatidbruch (c), zwei symmetrischen Translokationen (d), zwei asymmetrische Translokationen (d') und zwei Translokationen aus drei Chromosomen (d'')



ABBILDUNG 8: Metaphaseplatte aus der Trenimonkontrolle mit einem Chromatidbruch (b) und einem Triradial (g)

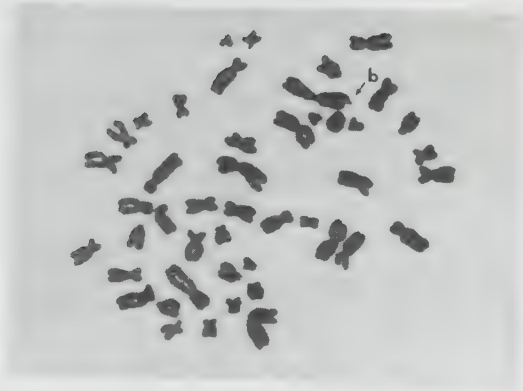


ABBILDUNG 9: Metaphaseplatte aus der NaF-Kontrolle mit einem Chromatidbruch (b)



ABBILDUNG 10: Metaphaseplatte aus der Serie NaF 0-65 I mit einem Isochromatidbruch (c), zwei symmetrischen (d) und einer asymmetrischen (d') Translokation



ABBILDUNG 11: Metaphaseplatte aus der Trenimonkontrolle mit einem Isochromatidbruch (c), zwei Triradialen (g) und einem azentrischen Ring (f).

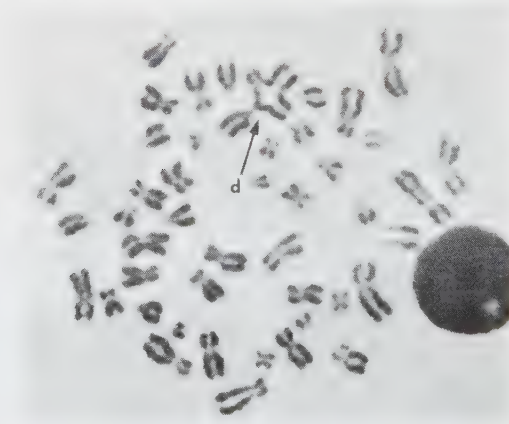


ABBILDUNG 12: Metaphaseplatte aus der Serie NaF 15-74 II mit einer symmetrischen Translokation (d)

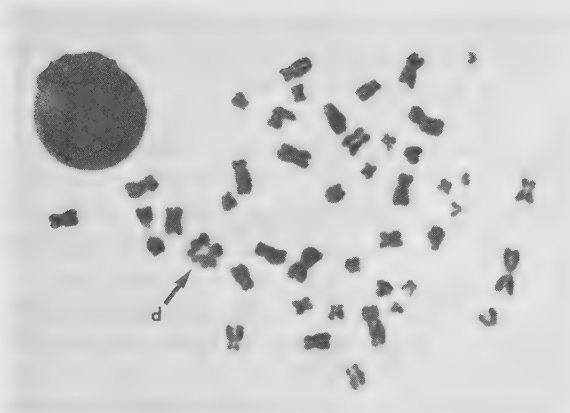


ABBILDUNG 13: Metaphaseplatte aus der Serie NaF 0-20 I mit einer
symmetrischen Translokation (d)

Quantitative Versuchsergebnisse

Nullkontrolle (K)

In unbehandelten Lymphozytenkulturen mit einer Kulturdauer von 53 Stunden (Colcemidzugabe: 5 Stunden vor Kulturabbruch) betrug die spontane Aberrationsrate für achromatische Läsionen 9,5 % (0,105 AL pro Zelle), für Chromatidbrüche 4,5 % (0,045 B' pro Zelle) und für Isochromatidbrüche 1 % (0,01 B'' pro Zelle) (Tab. 14, Abb. 20 bis 25).

NaF-Kontrolle (F)

Nach NaF-Dauerbehandlung (Endkonzentration 10^{-3} M) traten in 53-Stundenkulturen (Colcemidzugabe: 5 Stunden vor Aufarbeitung) 10,66 % achromatische Läsionen (0,123 AL pro Zelle), 5 % Chromatidbrüche (0,05 B' pro Zelle) und 0,33 % Isochromatidbrüche (0,003 B'' pro Zelle) auf (Tab. 14, Abb. 20 bis 25).

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß NaF in einer Konzentration von 10^{-3} M keine chromosomenbrechende Wirkung hat. Sowohl in der Nullkontrolle wie auch in den NaF-Serien wurde keine Translokation gefunden.

Trenimonkontrollen (Treko I,II)

Von den Trenimonkontrollen und Kombinationsversuchen wurden jeweils Metaphasen erfaßt, die von 56 bis 65 Stunden (I) und von 65 bis 74 Stunden (II) durch Colcemideinwirkung angesammelt wurden, um möglicherweise auftretende Unterschiede in der Aberrationshäufigkeit in Abhängigkeit vom Aufarbeitungstermin erfassen zu können.

Bei den I-Kulturen (Colcemideinwirkung 56 bis 65 Stunden) konnten alle Aberrationstypen in der Reihenfolge B' > AL > B' > RB' registriert werden. Es wurden 31,5 % Isochromatidbrüche (0,4 B'' pro Zelle), 24 % achromatische Läsionen (0,375 AL pro Zelle), 29,5 % Chromatidbrüche (0,34 B' pro Zelle) und 15 % Translokationen (0,195 RB' pro Zelle) gefunden.

Unter RB' wurden alle aufgetretenen Reunionsfiguren wie Chromatidentranslokationen, Triradiale, dizentrische Chromosomen und

Ringe zusammengefaßt. Von den 28 Chromatidentranslokationen bestanden zwei aus drei Chromosomen, eine aus fünf Chromosomen, die übrigen waren Zweiertranslokationen. Außerdem fanden wir vier Triradiale, fünf dizentrische Chromosomen mit Fragment und zwei Ringe (Tab. 15, Abb. 20 und 23).

Bei den II-Kulturen (Colcemideinwirkung 65 bis 74 Stunden) traten 28 % Isochromatidbrüche (0,36 B' pro Zelle), 26,5 % Chromatidbrüche (0,315 B' pro Zelle), 18,5 % achromatische Läsionen (0,24 AL pro Zelle) und 13 % Translokationen (0,175 RB' pro Zelle) auf. Die Anordnung der Häufigkeiten ist hier B' > B' > AL > RB'. In den 13 % Reunionsfiguren sind 22 Chromatidentranslokationen aus zwei Chromosomen, eine Dreiertranslokation, sechs Triradiale, fünf dizentrische Chromosomen mit Fragment und ein Ring enthalten (Tab. 16, Abb. 21 und 24).

Faßt man die Aberrationsraten der I- und II-Kulturen (I+II) zusammen, ergibt sich die Reihenfolge B' > B' > AL > RB'. Im einzelnen wurden 29,75 % Isochromatidbrüche (0,38 B' pro Zelle), 28 % Chromatidbrüche (0,327 B' pro Zelle), 21,25 % achromatische Läsionen (0,307 AL pro Zelle) und 14 % Translokationen (0,18 RB' pro Zelle) registriert (Tab. 17, Abb. 22 und 25).

Bei einem Vergleich der Aberrationshäufigkeiten beider Experimente (I und II) zeigt sich, daß die Aberrationsraten der Trenimonkontrolle II - statistisch nicht signifikant - etwas unter denen der Trenimonkontrolle I liegen.

Auch der höhere Prozentsatz ungeschädigter Metaphaseplatten bei Treko II ist ein Hinweis auf eine geringere Schädigung. Bei den I-Kulturen blieben 28,5 %, bei den II-Kulturen 35 % der Metaphasen ungeschädigt (Tab. 18, Abb. 27).

Auffallend sind die hohen Isochromatidbruchraten in beiden Trenimonversuchen.

Kombinationsexperimente (Versuche 1 bis 6)

Den Kombinationsserien wurde außer Trenimon, das immer von 15 bis 20 Stunden Kulturdauer einwirkte (Endmolarität $0,5 \times 10^{-6}$ M),

noch NaF (Endmolarität 10^{-5} M) zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus hinzugesetzt. Die einzelnen NaF-Zeitvariationsversuche sind in Material und Methode ausführlich beschrieben (siehe Schema auf Seite 20).

Im Hinblick auf mögliche Wechselwirkungen zwischen Trenimon und NaF könnte man folgendes erwarten:

1. Eine Erhöhung der Aberrationsrate
 2. Eine Senkung der Aberrationsrate
 3. Die Trenimon-induzierte Aberrationsrate wird nicht beeinflusst.
- Darüberhinaus würde sich bei den Möglichkeiten 1. und 2. die Frage nach der Phase des Zellzyklus stellen, in der NaF die von Trenimon in G_1 induzierte Aberrationsrate beeinflusst.

Im folgenden sollen die Aberrationshäufigkeiten der Kombinationsversuche mit den dazugehörigen Trenimonkontrollen verglichen werden (Tab. 15, 16, 17; Abb. 20 bis 27).

Die Raten der Chromatidbrüche, Isochromatidbrüche und Translokationen in den Kombinationsversuchen 1 bis 6 liegen fast alle unter den jeweiligen Werten der Trenimonkontrollen (Tab. 15, 16, 17; Abb. 20 bis 26). Eine Ausnahme bildet die Serie NaF 15-74 II, in der die Chromatidbruchrate von 0,315 B' pro Zelle mit der der Trenimonkontrolle übereinstimmt.

Die im Vergleich zur Trenimonkontrolle (Treko I: 0,375 AL pro Zelle; Treko II: 0,24 AL pro Zelle; Treko I+II: 0,307 AL pro Zelle) höheren Raten achromatischer Läsionen in den Versuchen NaF 0-20 II (0,245 AL pro Zelle), NaF 20-74 II (0,275 AL pro Zelle), NaF 0-74 II (0,286 AL pro Zelle), NaF 0-65 I (0,485 AL pro Zelle), NaF 15-74 I+II (0,322 AL pro Zelle) und NaF 0-74 I+II (0,366 AL pro Zelle) lassen sich mit dem χ^2 -Test nicht statistisch absichern. Die P-Werte liegen alle über 0,05 (siehe Tab. 15, 16 und 17).

Eine Erhöhung der Trenimon-induzierten AL-, B'-, B''- und RB'-Raten durch NaF kann demnach eindeutig ausgeschlossen werden.

Für eine senkende Wirkung des NaF auf die in Kombination mit Trenimon auftretenden Aberrationsraten sprechen die oben genannten Befunde an Chromatidbrüchen, Isochromatidbrüchen und Translokationen.

Die Erniedrigung der Häufigkeiten von B', B'' und RB' wird auch durch eine Aufsummierung der Aberrationshäufigkeiten nach Bruchereignissen deutlich (Tab. 18, Abb. 26). Chromatidbrüche werden bei dieser Aufstellung als ein Bruchereignis, Isochromatidbrüche und Translokationen als zwei Bruchereignisse gewertet.

Eine aberrationssenkende Wirkung bestätigt auch der bis auf Versuch NaF 15-74 II signifikant höhere Anteil ungeschädigter Metaphaseplatten in den Kombinationsexperimenten, gemessen an den Trenimon-Vergleichswerten (Tab. 18, Abb. 27).

Die Senkung der AL-, B'-, B''- und RB'-Raten wurde nach dem Vierfelder-Chi²-Test geprüft (Tab. 14, 15 und 16):

In den Versuchen NaF 15-20 I, NaF 15-20 II, NaF 15-20 I+II und NaF 20-65 I wurde die Rate der achromatischen Läsionen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P \leq 0,05$ gesenkt.

Bei den Chromatidbrüchen konnte eine Erniedrigung in folgenden Versuchen mit einem $P \leq 0,05$ abgesichert werden:

NaF 15-20 I+II, NaF 0-15 I, NaF 0-15 II, NaF 0-15 I+II, NaF 20-74 I+II, NaF 0-20 I, NaF 0-20 I+II.

Ein $P \leq 0,05$ wurde bei den Isochromatidbruchraten der Versuche NaF 15-20 I, NaF 15-20 I+II; NaF 0-15 I, NaF 0-15 II, NaF 0-15 I+II; NaF 20-65 I, NaF 20-74 I+II; NaF 0-20 I+II und NaF 0-74 I+II berechnet.

Die Rate der Translokationen wurde in den Versuchen NaF 15-20 II, NaF 15-20 I+II; NaF 0-15 II, NaF 0-15 I+II; NaF 20-65 I und NaF 20-74 I+II im Vergleich zur Trenimonkontrolle signifikant gesenkt ($P \leq 0,05$).

Mit dem Vierfelder-Chi²-Test wurden die Häufigkeiten von AL, B', B'' und RB' jeweils für sich mit dem jeweiligen Trenimonwert in Beziehung gesetzt.

Auf diese Weise konnte über jede einzelne AL-, B'-, B''-, RB'-Häufigkeit eine Aussage getroffen werden, ein Zusammenfassen aller Aberrationstypen war dagegen mit diesem Test nicht durchführbar.

Dies wurde sowohl mit dem Verfahren von Friedman als auch mit dem multiplen Vergleich nach Wilcoxon und Wilcox möglich.

Mit dem Friedman-Test wurde ermittelt, daß nicht alle Behandlungsproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Anschließend wurde nach Wilcoxon und Wilcox geprüft, welche der NaF-Behandlungen sich signifikant von der Trenimonkontrolle unterscheidet.

Bei diesem Verfahren wurden alle vier Aberrationstypen in den Vergleich mit einbezogen.

Nach diesem Test kann man feststellen, daß NaF eine Senkung der Aberrationsrate mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 0,05$ in den Versuchen NaF 0-15 I+II, NaF 15-20 I+II und NaF 20-65 I verursacht hat. Die Erniedrigung der Aberrationshäufigkeiten in den Versuchen NaF 0-15 I und NaF 0-15 II ist auf dem 10 %-Niveau abgesichert.

Aus der Erniedrigung der Aberrationsraten mit Ausnahme der achromatischen Läsionen in allen Kombinationsexperimenten kann auf eine antimutagene Wirkung des NaF geschlossen werden.

Betrachtet man die Metaphaseplatten, die im Bereich von 56 bis 74 Stunden erfaßt wurden, zeigt sich, daß die Senkung der Trenimon-induzierten Aberrationsrate signifikant ist, wenn NaF vor (NaF 0-15) oder gleichzeitig (NaF 15-20) mit dem Mutagen einwirkt.

Die Abweichungen der Aberrationshäufigkeiten von den Trenimon-Vergleichswerten sind in den Versuchen NaF 0-20 I, NaF 0-20 II, NaF 20-74 II, NaF 15-65 I, NaF 15-74 II, NaF 0-65 I und NaF 0-74 II statistisch nicht signifikant.

Insgesamt wurden in den Kombinationsversuchen 302 Translokationen registriert. Sie setzen sich aus Chromatidentranslokationen aus zwei Chromosomen, Mehrfachchromatidentranslokationen, Triradialen, dizentrischen Chromosomen und Ringen zusammen.

Chromatidentranslokationen aus zwei Chromosomen wurden in allen Versuchen beobachtet, Mehrfachtranslokationen dagegen nur in den Versuchen NaF 15-65 I, NaF 0-65 I, NaF 0-20 II, NaF 20-74 II, NaF 15-74 II und NaF 0-74 II.

In den Kombinationsversuchen NaF 0-20 II, NaF 0-65 I und NaF 20-74 II sind die Mehrfachtranslokationen im Vergleich zu den Trenimonexperimenten leicht erhöht.

Triradiale traten in allen Serien mit Ausnahme von NaF 0-20 I, NaF 15-20 II und NaF 0-15 II auf. Dizentrische Chromosomen wurden in allen Versuchen außer NaF 15-20 I beobachtet. In Versuch NaF 0-20 I wurde ein Ring gefunden.

Eine Aufschlüsselung der Translokationstypen gibt Tabelle 19.

Eine Aufstellung über die Klassenhäufigkeiten der achromatischen Läsionen, Chromatidbrüche, Isochromatidbrüche und Translokationen in Trenimonkontrollen und Kombinationsversuchen geben die Tabellen 20 bis 23.

Die Klassenhäufigkeiten der Kombinationsexperimente schwanken um die Werte der Trenimonkontrollen. Zellen mit vier und mehr Aberrationen eines Typs traten relativ selten auf. Eine Ausnahme bildet der Versuch NaF 0-20 II: In einer Zelle wurden sechs Chromatidbrüche, in einer anderen Platte sechs Translokationen beobachtet (Abb. 7). Neun achromatische Läsionen in einer Metaphaseplatte wurden im Versuch NaF 20-65 I registriert.

ABBILDUNG 14

Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse) im Kontrollversuch (Versuch A)

● — ● Serie a
o --- o Serie b

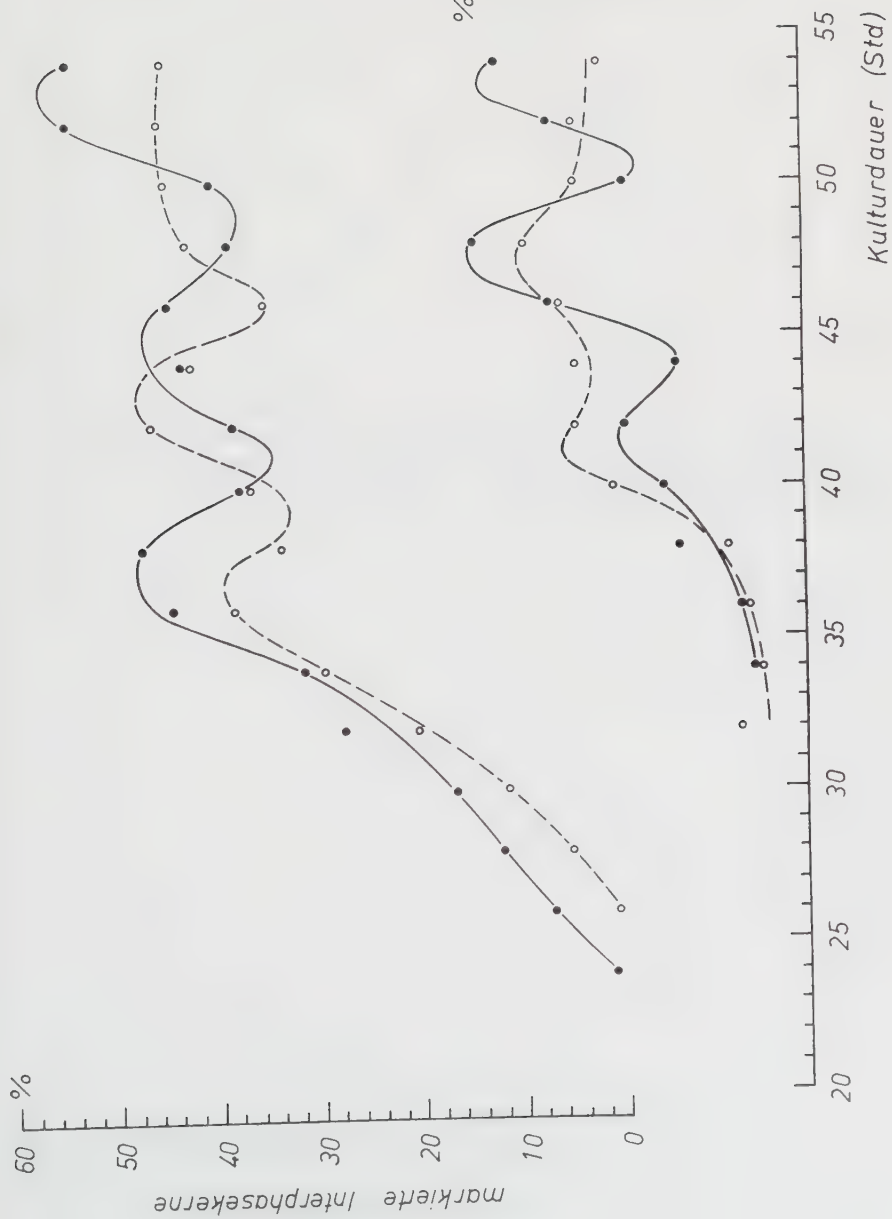


ABBILDUNG 15

Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse) im NaF-Versuch (Versuch B)

• ——— • Serie a
o --- o Serie b

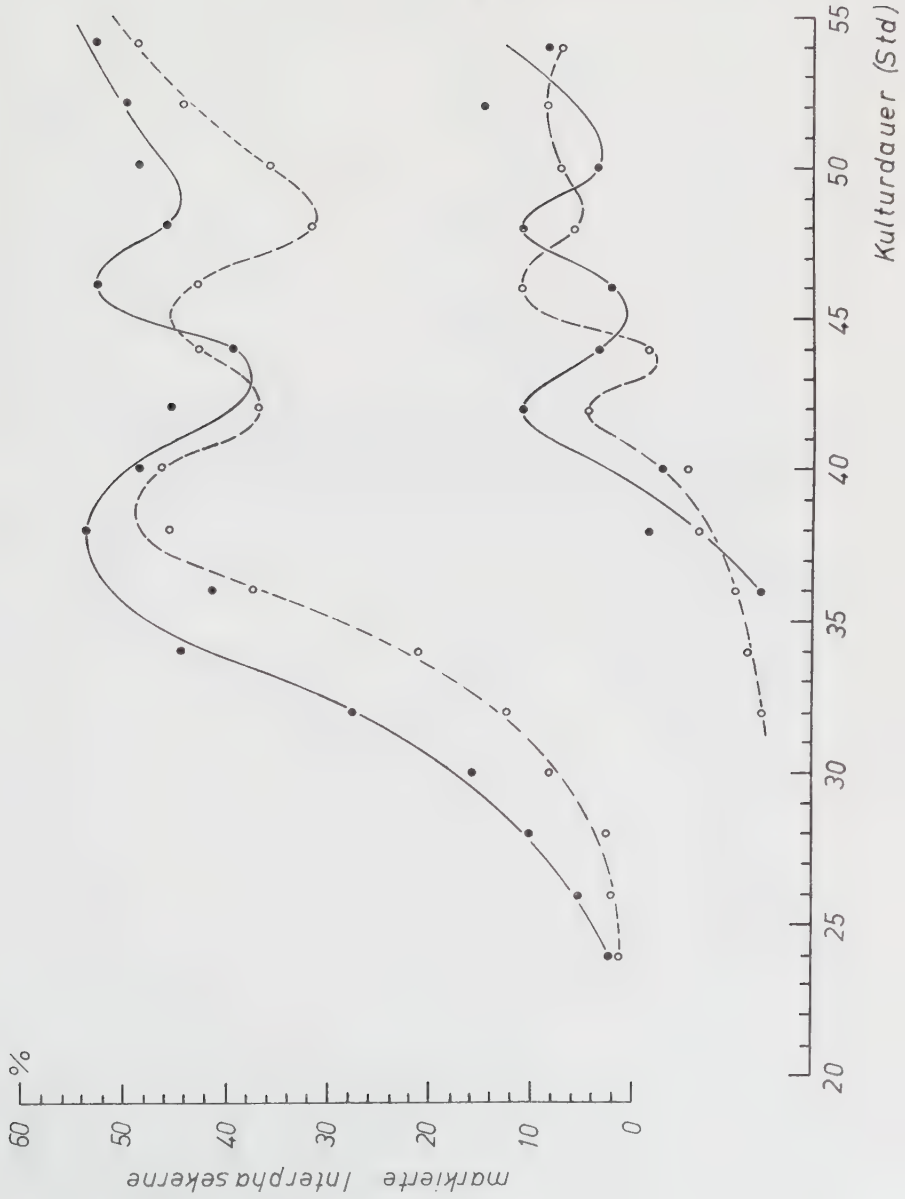


ABBILDUNG 16

Vergleich der Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und der Mitoseindices (rechte Ordinate) von Kontrolle (Versuch A) und NaF-Versuch (Versuch B)

Die Kurven geben die gemittelten Werte aus a- und b-Serien wieder

• — • KO a+b
o --- o NaF a+b

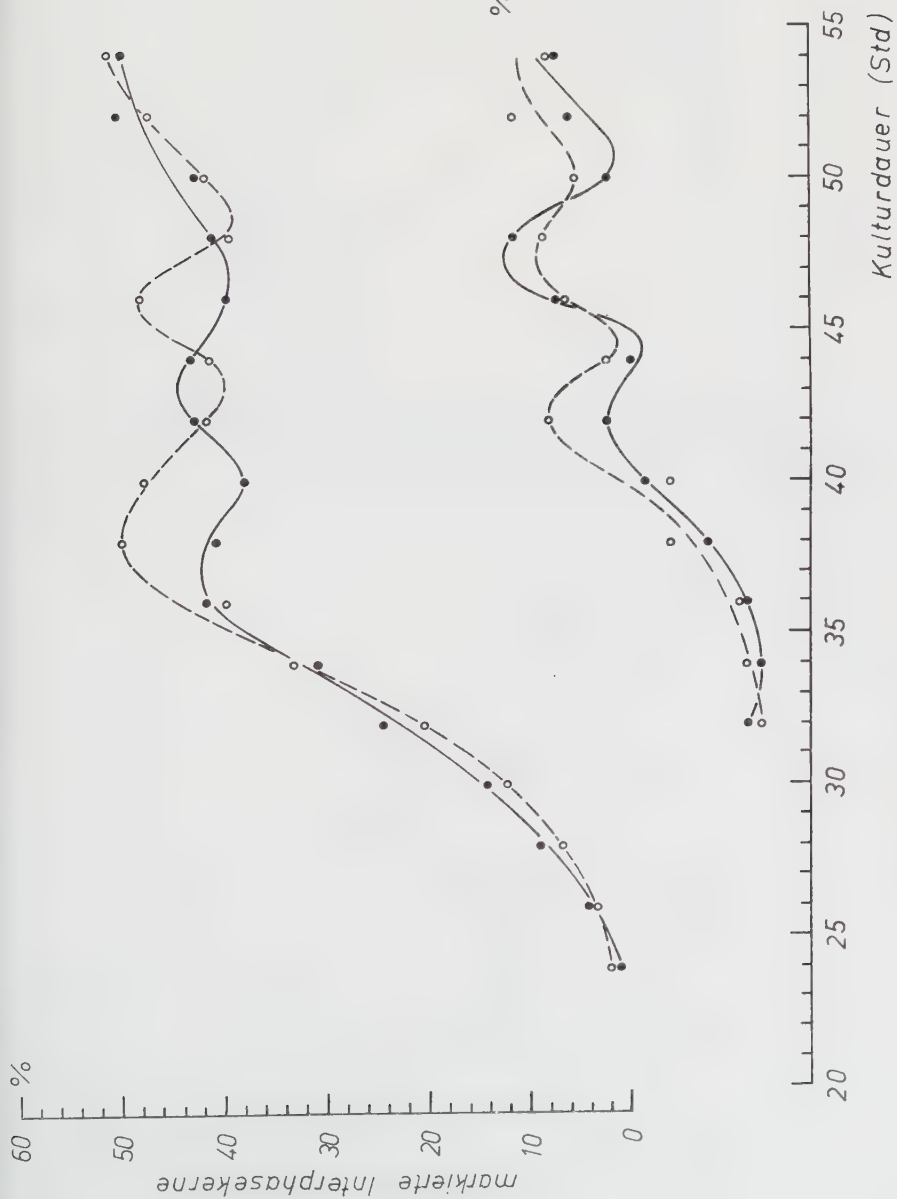


ABBILDUNG 17

Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse) im Trenimon-Versuch (Versuch C)

• — • Serie a
o --- o Serie b

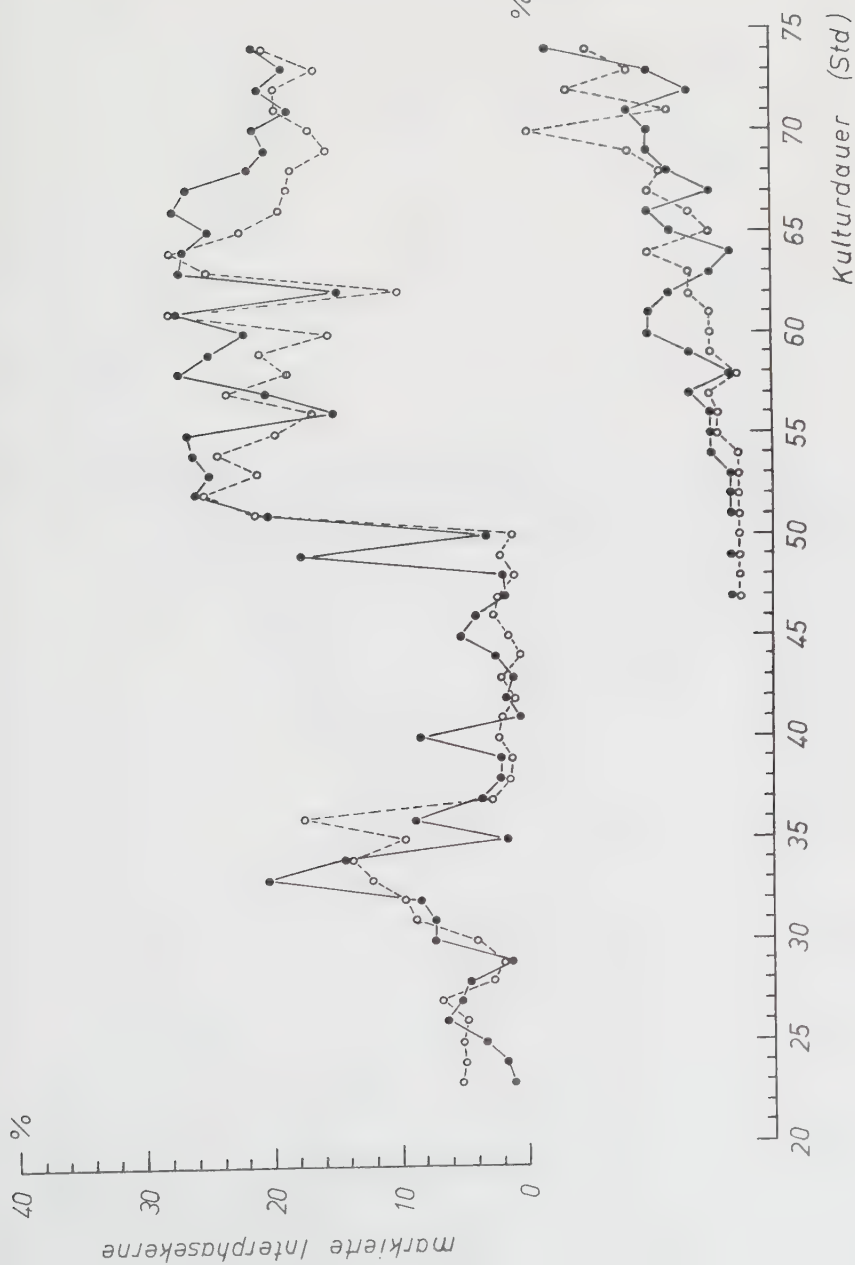


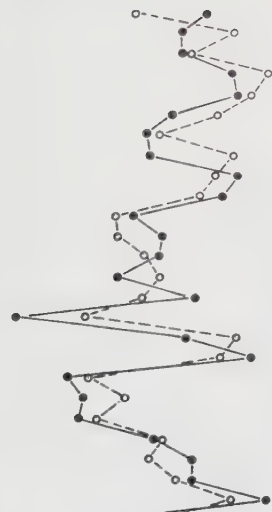
ABBILDUNG 18

Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse) im Kombinationsversuch (Versuch D)

• — • Serie a
o --- o Serie b

40
30
20
10
0

markierte Interphasekerne



1.0
0.5
0

Mitoseindex

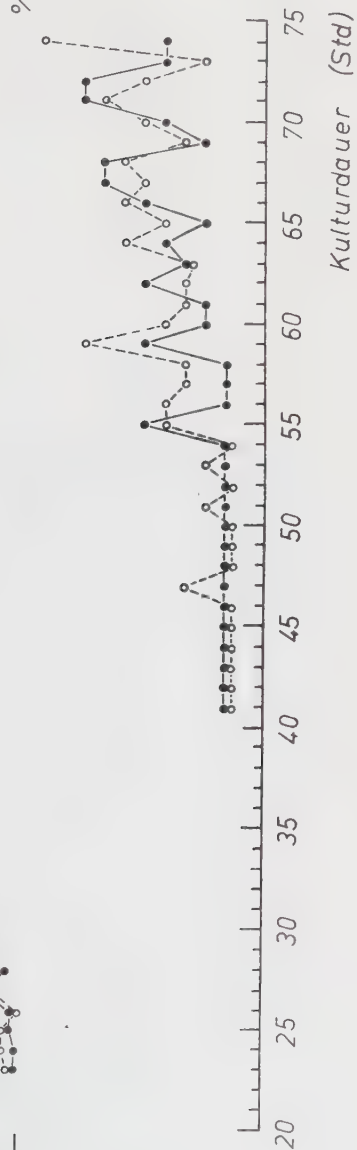
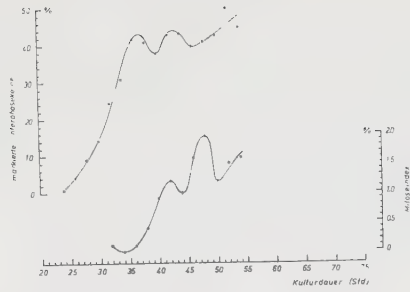


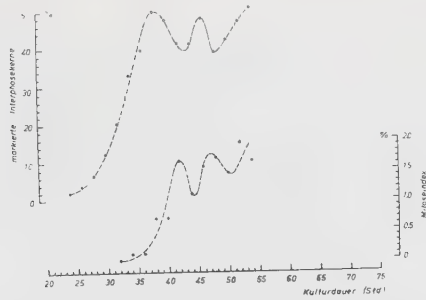
ABBILDUNG 19

Gegenüberstellung der Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und der Mitoseindices (rechte Ordinate) der Versuche Kontrolle (Versuch A), NaF (Versuch B), Trenimon (Versuch C) und Kombination NaF + Trenimon (Versuch D). Für Versuch A und B wurden die gemittelten Werte aus a- und b-Serien abgebildet

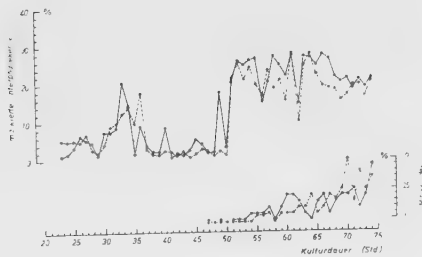
Versuch A



Versuch B



Versuch C



Versuch D

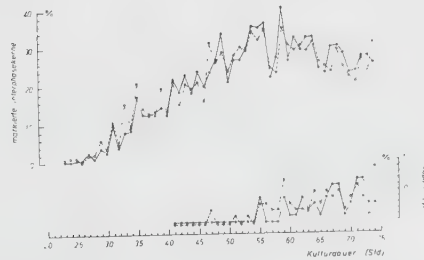


ABBILDUNG 20

Versuch E

Prozentsätze achromatischer Läsionen (AL), Chromatidbrüche (B'), Isochromatidbrüche (B'') und Chromatidentranslokationen (RB') in der Nullkontrolle (K), der NaF-Kontrolle (F), in den I-Kulturen von Trenimonkontrolle (schraffierte Säule) und den Kombinationsversuchen 1 bis 6 (1-6)

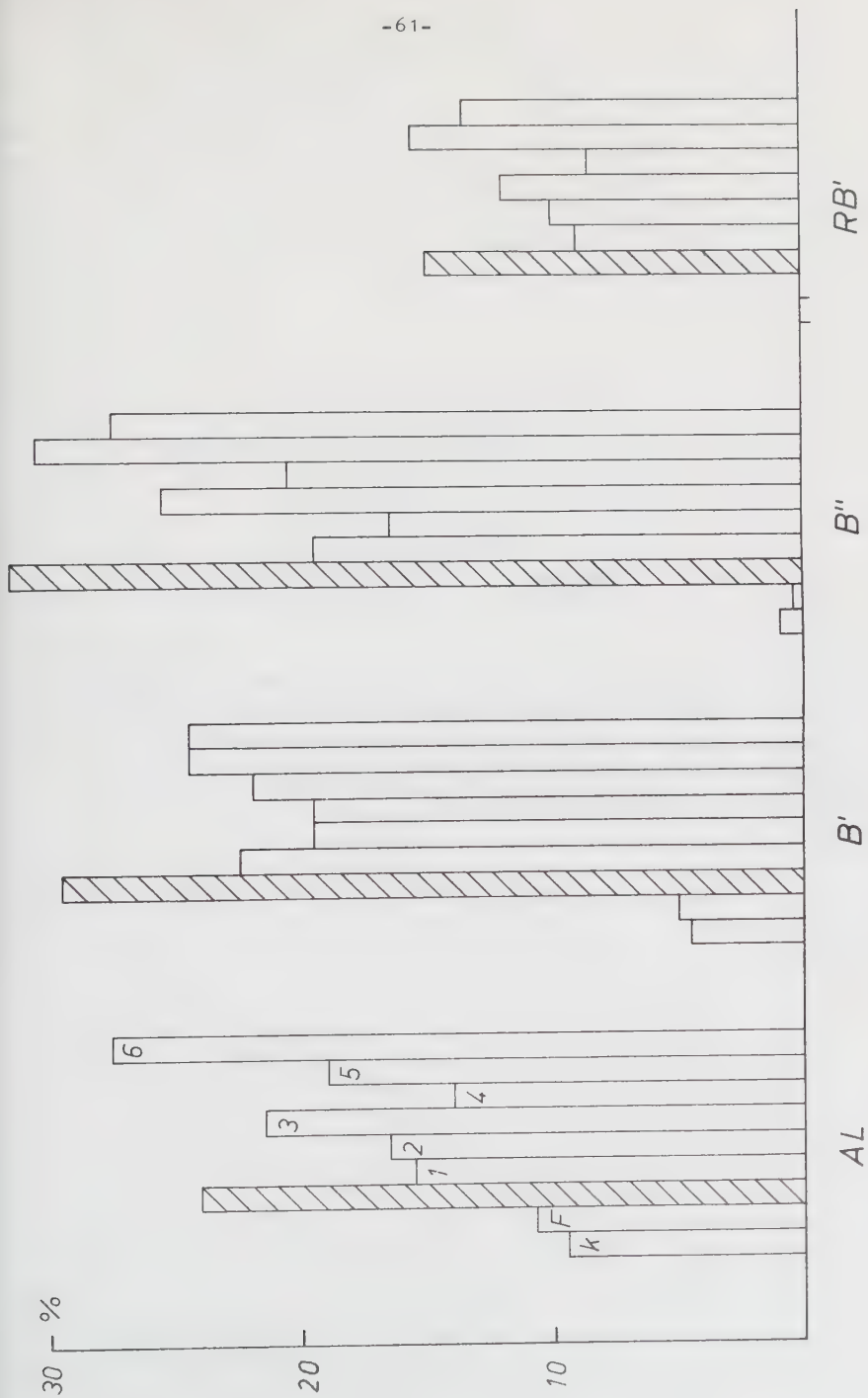


ABBILDUNG 21

Versuch E

Prozentsätze achromatischer Läsionen (AL), Chromatidbrüche (B'), Isochromatidbrüche (B'') und Chromatidentranslokationen (RB') in der Nullkontrolle (K), der NaF-Kontrolle (F), in den II-Kulturen von Trenimonkontrolle (schraffierte Säule) und Kombinationsversuchen 1 bis 6 (1-6)

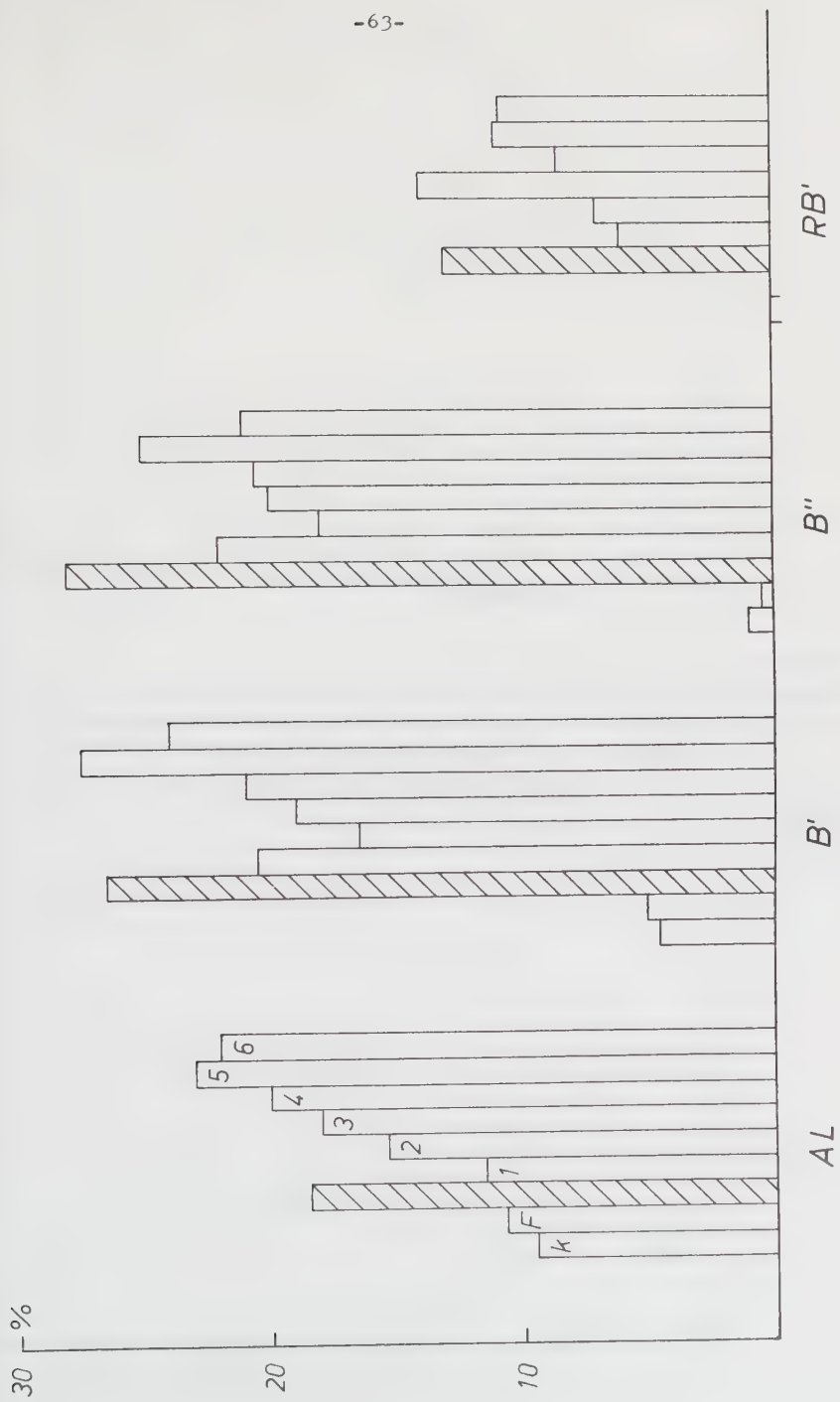


ABBILDUNG 22

Versuch E

Prozentsätze achromatischer Läsionen (AL), Chromatidbrüche (B'), Isochromatidbrüche (B'') und Chromatidentranslokationen (RB') in der Nullkontrolle (K), der NaF-Kontrolle (F), in den Kulturen I+II von Trenimonkontrolle (schraffierte Säule) und Kombinationsversuchen 1 bis 6 (1-6)

30 %

20

10

AL

B'

B''

RB'

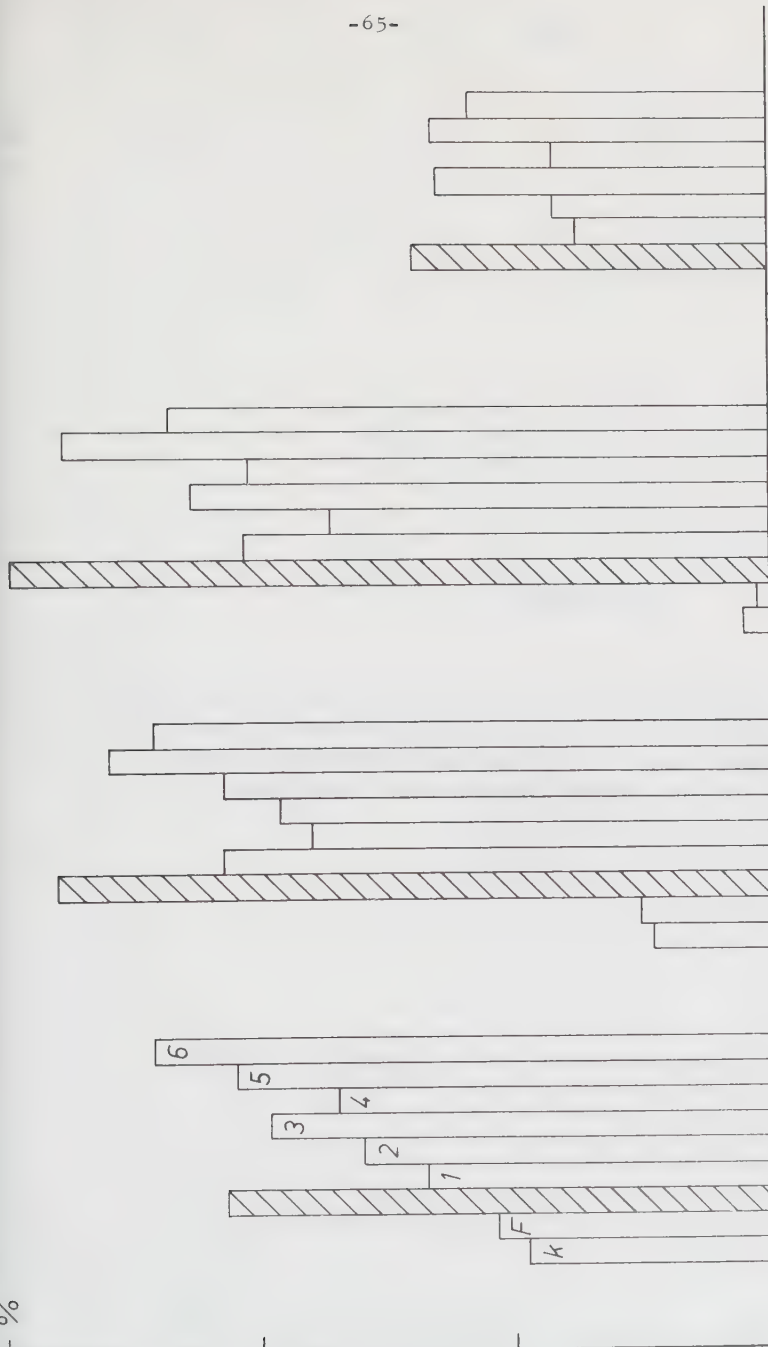


ABBILDUNG 23

Versuch E

Anzahl der achromatischen Läsionen (AL), Chromatidbrüche (B'),
Isochromatidbrüche (B'') und Chromatidentranslokationen (RB')
in der Nullkontrolle (K), der NaF-Kontrolle (F), in den
I-Kulturen von Trenimonkontrolle (schraffierte Säule) und
Kombinationsversuchen 1 bis 6 (1-6)

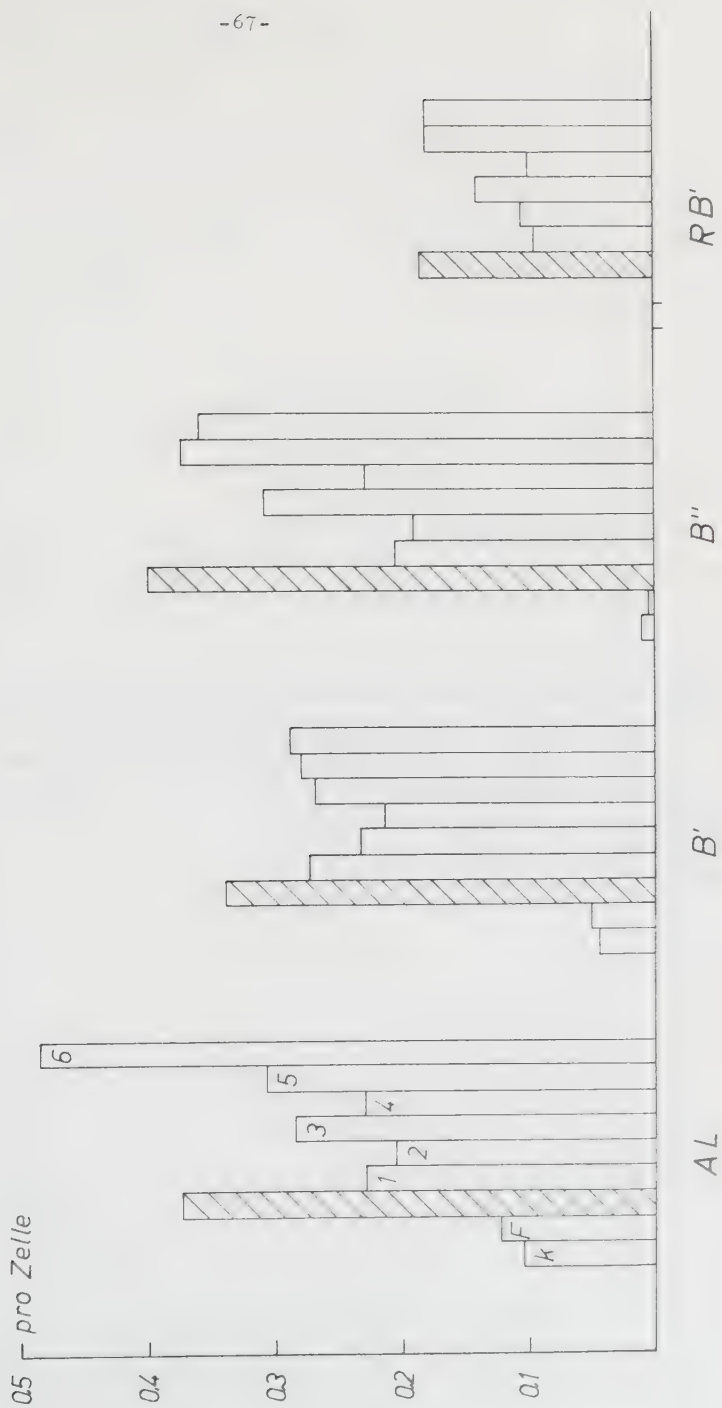


ABBILDUNG 24

Versuch E

Anzahl der achromatischen Läsionen (AL), Chromatidbrüche (B'), Isochromatidbrüche (B'') und Chromatidentranslokationen (RB') in der Nullkontrolle (K), der NaF-Kontrolle (F), in den II-Kulturen von Trenimonkontrolle (schraffierte Säule) und Kombinationsversuchen 1 bis 6 (1-6)

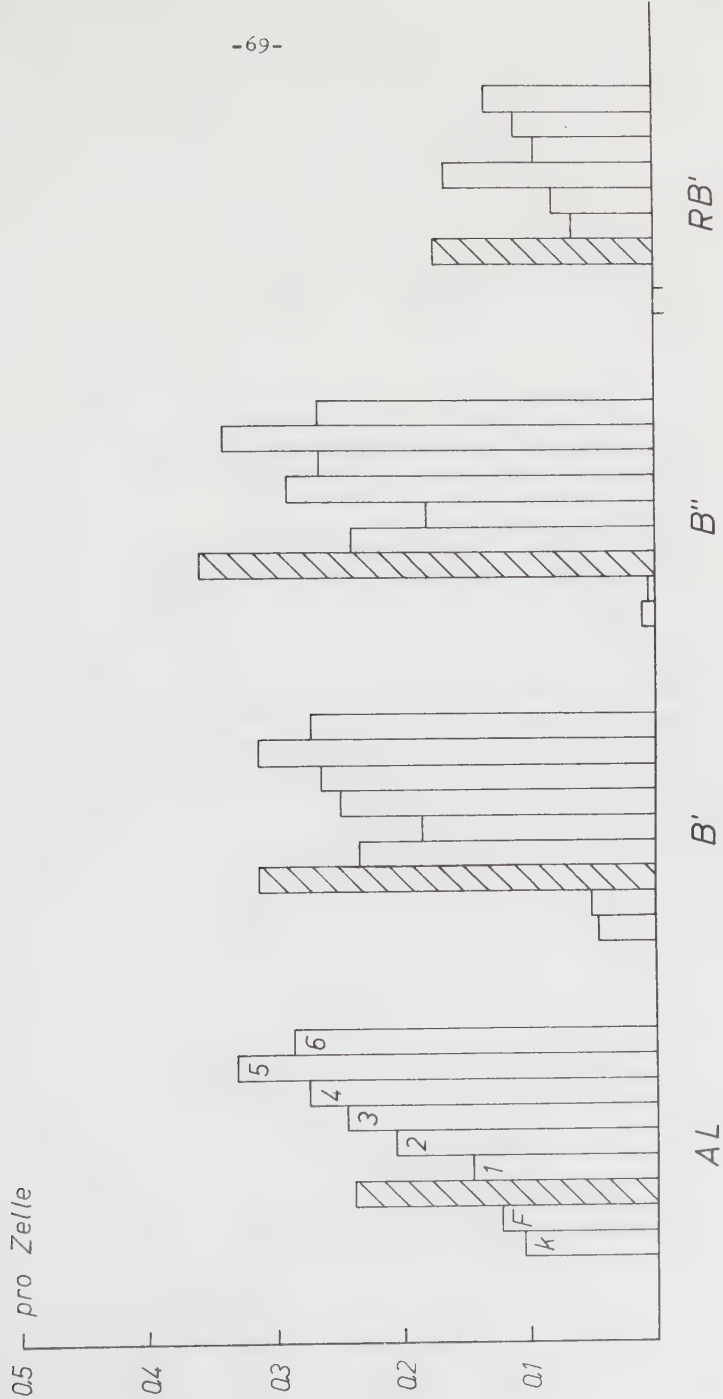


ABBILDUNG 25

Versuch E

Anzahl der achromatischen Läsionen (AL), Chromatidbrüche (B'), Isochromatidbrüche (B'') und Chromatidentranslokationen (RB') in der Nullkontrolle (K), der NaF-Kontrolle (F), in den Kulturen I+II von Trenimonkontrolle (schraffierte Säule) und Kombinationsversuchen 1 bis 6 (1-6)

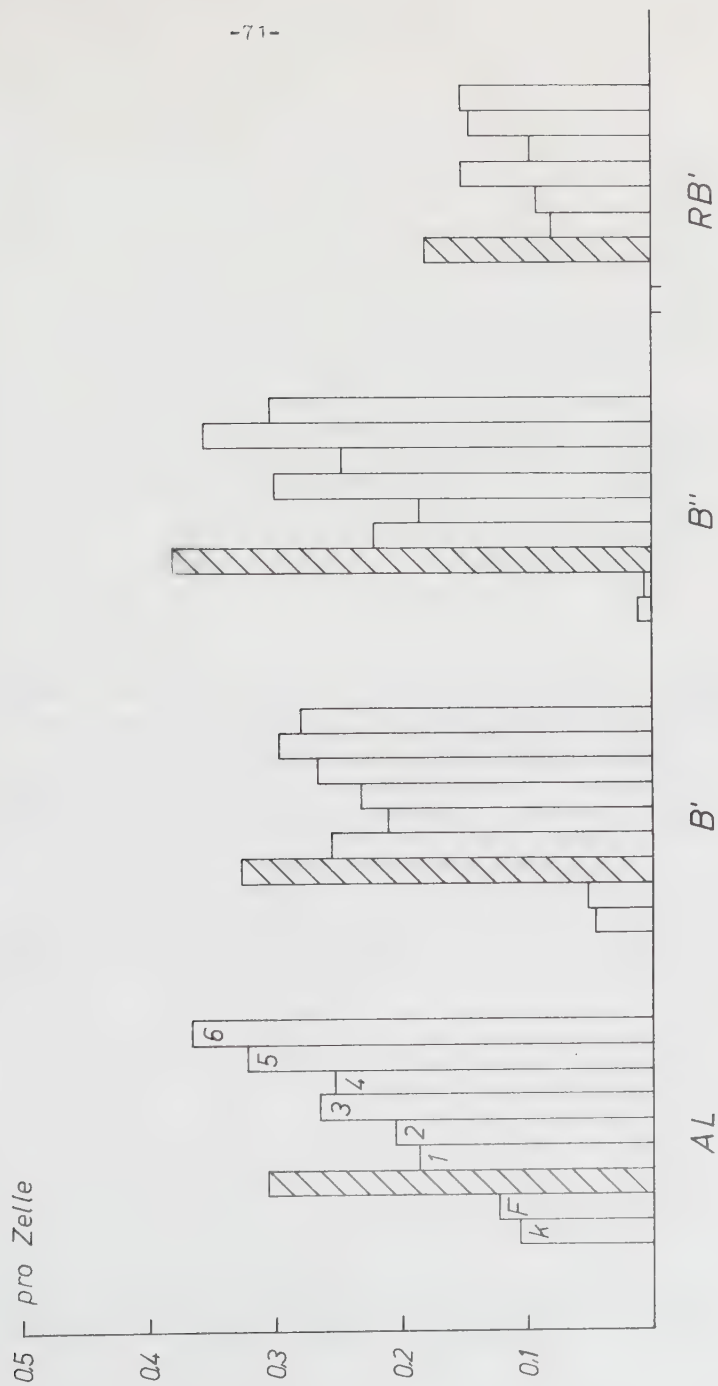


ABBILDUNG 26

Versuch E

Summen der Bruchereignisse pro Zelle in der Nullkontrolle (K),
der NaF-Kontrolle (F), in den Kulturen I und II von Trenimon-
kontrolle (schraffierte Säule) und Kombinationsversuchen
1 bis 6 (1-6)

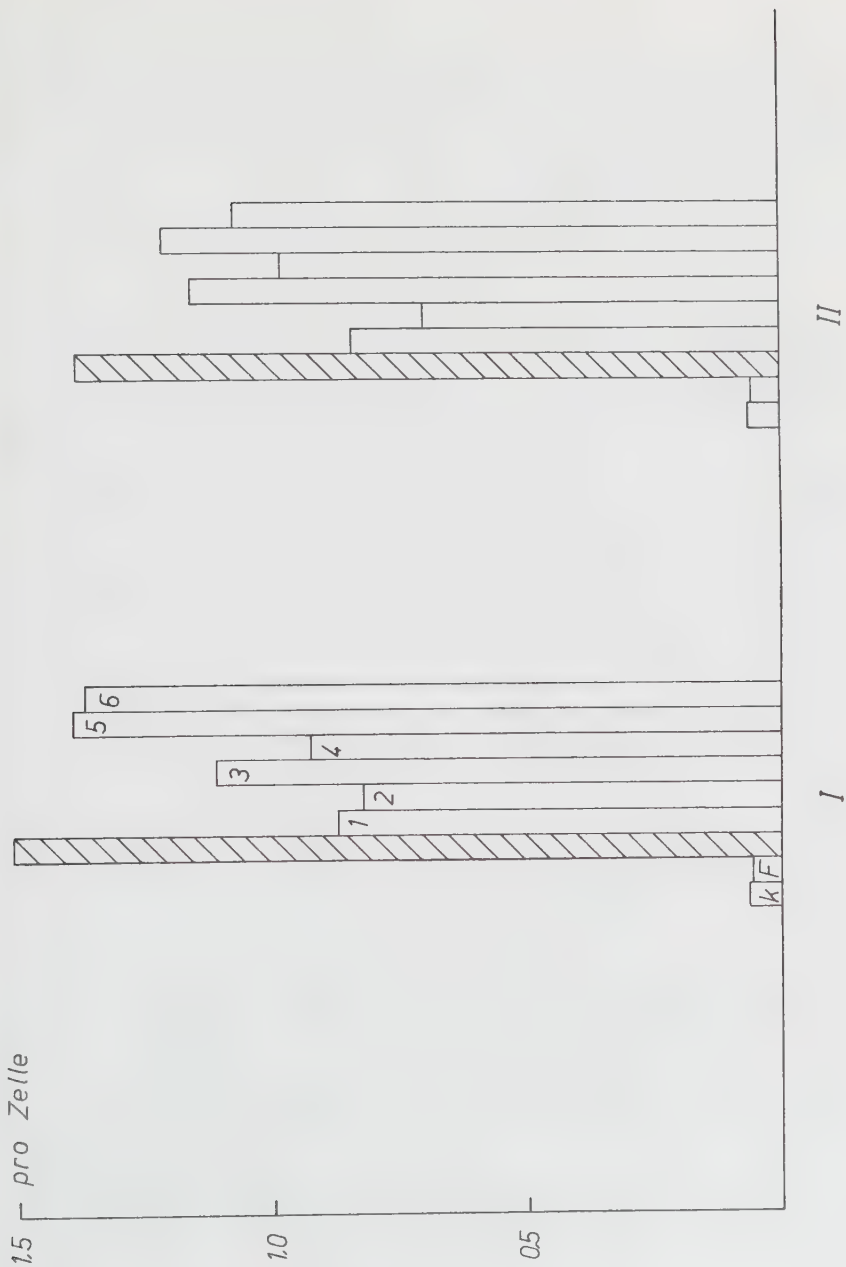
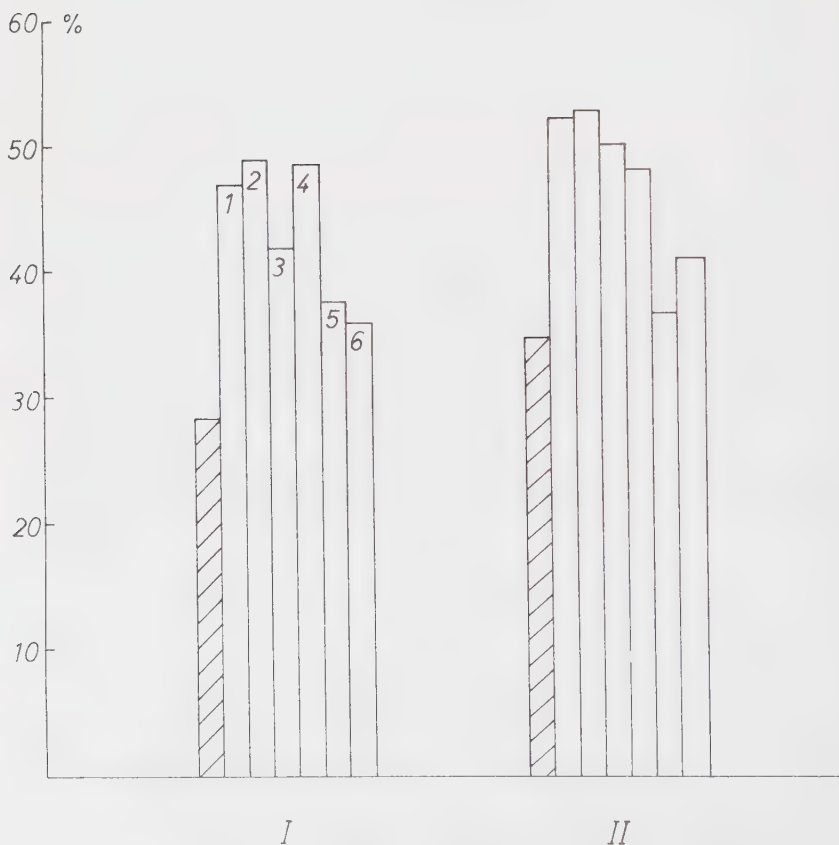


ABBILDUNG 27

Versuch E

Prozentsätze ungeschädigter Metaphaseplatten in den Kulturen I und II von Trenimonkontrolle (schraffierte Säule) und Kombinationsversuchen 1 bis 6 (1-6)



IV. DISKUSSION

Zellzyklus in unbehandelten Lymphozytenkulturen (Versuch A)

In den Kontrollexperimenten beginnt die DNS-Synthese 26 Stunden nach PHA-Zugabe und verläuft im untersuchten Zeitraum bis 54 Stunden mit zwei Maxima bei etwa 36 und 44 Stunden Kulturdauer. Für die Mitoseindices ergibt sich ein der DNS-Synthese entsprechender biphasischer Kurvenverlauf. Die Mitosemaxima liegen bei 42 und 48 Stunden von Kulturbeginn an.

Mit dieser Versuchsserie konnten die Ergebnisse von DUDIN et al. (1974) mit dem Blut eines anderen Spenders bestätigt werden. Diese Autoren fanden zwei Zellpopulationen in Zwei-Tage-Lymphozytenkulturen mit DNS-Synthesemaxima bei 34 und 40 Stunden Kulturdauer und Mitosemaxima bei 44 und 48 Stunden.

Die aufgetretenen Unterschiede dürften darauf beruhen, daß das verwendete Venenblut von verschiedenen Spendern stammte. AOKI und MOORE (1970) zeigten, daß die Länge der einzelnen Zellzyklusstadien, besonders die der G_1 - und S-Phase, vom jeweiligen Blutspender abhängt. Über eine zeitliche Schwankung um mehrere Stunden im Auftreten von Mitosen bei verschiedenen Spendern berichten BENDER und BREWEN (1969). Auch Befunde von SALZMAN et al. (1966) weisen darauf hin, daß sich bei verschiedenen Individuen die RNS- und DNS-Synthesemuster in PHA-stimulierten Lymphozyten signifikant unterscheiden können.

Der Beginn der DNS-Synthese in Lymphozytenkulturen wird von LOEB et al. (1970) mit etwa 20 Stunden, von BENDER und PRESCOTT (1962), SALZMAN et al. (1966) mit 24 Stunden und von LIMA-DE-FARIA et al. (1961) mit 30 Stunden nach Kulturanatz angegeben.

In den Experimenten von BENDER und PRESCOTT (1962) ergab sich eine erste Mitosewelle nach 42 Stunden Kulturdauer. Schon 1963 fand MICHALOWSKI, allerdings in Drei-Tage-Lymphozytenkulturen zwei Maxima der DNS-Synthese bei 60 und 72 Stunden Kulturdauer. Jeweils 5 Stunden später, nach 65 bzw. 77 Stunden, wurden Mitosemaxima registriert. Der Autor postuliert zwei Zellpopulationen, die zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus mit der DNS-Synthese beginnen.

Mit $^3\text{HTdR}$ -Markierungsexperimenten konnten DUDIN et al. (1974) zeigen, daß 50 % der mitotisch aktiven Zellen nach 36 Stunden

ihre DNS-Synthese abgeschlossen haben, während weitere 50 % erst zu diesem Zeitpunkt mit der Replikation der DNS beginnen. BEEK und OBE (1975) untersuchten das RNS-Synthesemuster in Zweitages-Lymphozytenkulturen in stündlichen Abständen von Kulturbeginn an bis 25 Stunden Kulturdauer. Aus dem biphasischen Verlauf der RNS-Synthese (RNS-Synthesemaxima bei 14 und 19 Stunden) schließen die Autoren, daß die beiden Zellpopulationen (DUDIN et al., 1974; diese Arbeit) auch mit der RNS-Synthese zeitlich versetzt beginnen.

STEFFEN und STOLZMANN (1969) erhielten in Lymphozytenkulturen nach Entfernung eines Syntheseblocks am Übergang von G_1 nach S zwei Mitosemaxima im Abstand von 6 Stunden. Das erste Maximum erscheint 15 Stunden nach Entfernung des G_1/S -Blocks.

Im vorliegenden Experiment beträgt die Zeitspanne von Beginn der DNS-Synthesephase (26 Stunden) bis zum ersten Mitosemaximum (42 Stunden) 16 Stunden, das zweite Maximum wird 6 Stunden später erreicht.

Zwischen den Ergebnissen von STEFFEN und STOLZMANN (1969) und den Befunden dieser Arbeit besteht demnach gute Übereinstimmung. Weitere Hinweise auf mindestens zwei Lymphozytenpopulationen bei JASINSKA et al. (1970, 1971) und JOHANSEN (1972). BENDER und BREWEN (1969), STEFFEN und MICHALOWSKI (1973) und MELLO et al. (1974) berichten über Subpopulationen in Lymphozytenkulturen, die sich in ihrer Strahlenempfindlichkeit und in der Länge der $S+G_2$ -Phase unterscheiden.

In Erweiterung und Ergänzung zu der Arbeit von DUDIN et al. (1974), in der zwei Subpopulationen in PHA-stimulierten 48-Stunden-Lymphozytenkulturen beschrieben wurden, konnten BEEK und OBE (1974) zeigen, daß die beiden Subpopulationen unterschiedlich empfindlich auf die Einwirkung eines alkylierenden Agens (A 139) reagieren. Mit A 139 wurden in der ersten Population (DNS-Synthesemaximum bei etwa 34 Stunden) drei mal mehr Chromatidentranslokationen induziert als in der zweiten Population (DNS-Synthesemaximum bei etwa 40 Stunden).

Die kleinen Lymphozyten des peripheren Blutes werden im Knochenmark gebildet und gelangen entweder direkt (B-Lymphozyten: bone-marrow derived lymphocytes) oder über die Thymusrinde (T-Lympho-

zyten: thymus-derived lymphocytes) in den Blutkreislauf. B- und T-Zellen sind morphologisch identisch, haben aber im Immunsystem unterschiedliche Funktionen (vgl. JERNE, 1973; BURNET, 1973). Nach Literaturangaben von SABOLOVIC et al. (1972), STERNSWÄRD et al. (1972) und WILSON und NOSSAL (1971) sind im peripheren Blut 32 - 34 % B-Zellen und 60 - 65 % T-Zellen enthalten. Dieses 2 : 1 Verhältnis von T- zu B-Lymphozyten ist jedoch während des Tages Schwankungen unterworfen (DICKLER et al., 1974; STEEL et al., 1974; CARSTAIRS, 1962).

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche Anteile von B- und T-Lymphozyten möglichst zu vermeiden, wurde das für die Versuche benötigte Blut nach Möglichkeit immer zur gleichen Tageszeit entnommen.

Unter dem Einfluß von PHA werden die kleinen Lymphozyten stimuliert und gewinnen ihre Teilungsfähigkeit wieder (NOWELL, 1960; COULSON und CHALMERS, 1964).

Nach Untersuchungen von JANOSSY und Mitarbeitern (1973) werden unter dem Einfluß von PHA aber zunächst nur die T-Lymphozyten stimuliert, die dann ihrerseits die B-Zellen aktivieren sollen (ANDERSSON et al., 1972; VISHNER, 1972). Demnach könnten die in den Blutkulturen nachweisbaren Lymphozytenpopulationen die T- und B-Zellen sein. Die jeweils ersten Maxima der DNS-Synthese (36 Stunden) und der Mitosen (42 Stunden) würden den T-Zellen, die beiden weiteren Maxima bei 44 Stunden (DNS-Synthese) und 48 Stunden (Mitosen) den B-Zellen entsprechen.

Mit dieser Erklärungsmöglichkeit in Einklang stehen Befunde von JASINSKA et al. (1970). Diese Autoren weisen darauf hin, daß PHA-stimulierte Lymphozyten Stoffe freisetzen, die auf unstimulierte Lymphozyten mitogen wirken.

In einer Untersuchung an bestrahlten Patienten erwiesen sich die T-Lymphozyten strahlensensitiver als die B-Zellen (BYFIELD et al., 1974). BEEK und OBE (1974) haben gezeigt, daß die erste Population (T-Zellen ?) empfindlicher auf A 139 reagiert als die zweite Population (B-Zellen ?).

Dagegen konnten PIGUET und VASSALLI (1972) an Mäuselymphozyten und LEVIS und ROBBINS (1970) mit menschlichen Lymphozyten zeigen, daß nach 48 Stunden Kulturdauer fast ausschließlich nur T-Zellen mitotisch aktiv sind.

Diese Befunde sprechen somit gegen eine Deutung der in Zwei-Tage-Kulturen gefundenen Subpopulationen als B- und T-Zellen, da hier das zweite Mitosemaximum bereits bei 48 Stunden erscheint. MELLO et al. (1974) diskutieren das Vorhandensein von vier Subpopulationen in menschlichen Lymphozyten, zwei T- und zwei B-Zellpopulationen.

Unterpopulationen von T-Lymphozyten wurden 1973 von OLSSON und CLAEISSON im Blut von Mäusen nachgewiesen.

Da die in dieser Arbeit beschriebenen Maxima der DNS-Synthese und der Mitosen im Abstand von nur wenigen Stunden aufeinander folgen, die T-Zellen aber erst nach einem Teilungszyklus in der Lage sein sollen, B-Zellen zu stimulieren (NAKAMURA et al., 1972), ist zu vermuten, daß die beiden Subpopulationen in den Zwei-Tage-Lymphozytenkulturen Unterpopulationen der T-Zellen sind. Eine genaue Klärung der Frage nach der Natur der beiden Subpopulationen in Zwei-Tage-Kulturen ist zur Zeit noch nicht möglich.

Zellzyklus in NaF-behandelten Lymphozytenkulturen (Versuch B)

In dieser Arbeit sollte auch untersucht werden, ob NaF den Trenimon-veränderten Zellzyklus beeinflusst. Um eine mögliche Wirkung von NaF beurteilen zu können, war es erforderlich, Lymphozytenkulturen mit NaF allein zu behandeln.

Die Befunde zeigen, daß NaF in der verwendeten Konzentration von 10^{-3} M weder den biphasischen Verlauf der DNS-Synthese noch die beiden Mitosemaxima in Zwei-Tage-Lymphozytenkulturen beeinflusst.

Dieses Ergebnis war für die weiteren Versuche dieser Arbeit von großer Bedeutung. Würde NaF den normalen Zellzyklus beeinflussen, dann wäre eine Interpretation der Ergebnisse nach kombinierter Einwirkung von Trenimon und NaF zumindest sehr erschwert, wenn nicht sogar unmöglich geworden. Wenn eine Dauerbehandlung mit NaF den Zellzyklus nicht beeinflusst, kann man davon ausgehen, daß NaF auch bei kürzeren Einwirkungszeiten den Generationszyklus in Zwei-Tage-Lymphozytenkulturen nicht verändern wird. Weitere Ausführungen zu dem Problem bei der Abhandlung der Versuche D und E.

Auch andere Autoren stellten im Konzentrationsbereich von 10^{-3} bis 10^{-4} M keine wachstumshemmende Wirkung von NaF fest: DEJONG (1968) an L- und HeLa-Zellen, VOROSHILIN und Mitarbeiter (1973) an menschlichen Lymphozyten.

In höheren Konzentrationen wirkt NaF auf Lymphozyten (VOROSHILIN et al., 1973), Säugerzellen (ALBRIGHT, 1964) und HeLa-Zellen (CARLSON und SUTTIE, 1967a,b) wachstumshemmend.

VOGEL (1973) fand eine Abnahme der Fertilität und Fekundität bei *Drosophila melanogaster* nach NaF-Behandlung im Konzentrationsbereich von $2,4 \times 10^{-3}$ bis $2,4 \times 10^{-2}$ M.

Über eine Mitosehemmung nach NaF-Einwirkung (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} M) bei *Hordeum vulgare* berichten BALE und HART (1973).

Zellzyklus nach Trenimonbehandlung (Versuch C)

Die Ergebnisse von Versuch C, in dem Lymphozytenkulturen fünf Stunden lang während der G_1 -Phase (15. bis 20. Stunde nach Kulturbeginn) mit $0,5 \times 10^{-6}$ M Trenimon behandelt wurden, können wie folgt zusammengefaßt werden:

Trenimon wirkt stark zellzyklusverzögernd. Sowohl die DNS-Syntheseraten als auch die Mitoseindices weichen erheblich von den Werten unbehandelter Lymphozytenkulturen ab. Mit Ausnahme der 3H -Thymidineinbauaktivität einiger Lymphozyten 30 bis 36 Stunden nach Kulturansatz, beginnen die meisten Zellen erst nach 48 Stunden Kulturdauer mit der DNS-Synthese. Die Häufigkeiten markierter Interphasekerne sind im Vergleich zum Kontrollversuch von über 50 % auf 30 % reduziert. Mitosen treten erst nach 54 Stunden Kulturdauer auf, die Mitoseindices sind in der beobachteten Zeitspanne erheblich erniedrigt.

Es ist schon lange bekannt, daß mit der Einwirkung mutagener Agenzien auf eine Zellpopulation ein zeitlich verzögerter Kernteilungsbeginn verknüpft ist. Ausmaß und Art der Verzögerung sind vom jeweiligen Agens, von der verwendeten Konzentration, der Behandlungsdauer und vom Stadium des Zellzyklus, in dem das Mutagen zur Einwirkung kommt, abhängig.

Die ausgeprägtesten Mitoseverzögerungen werden in der Regel in der DNS-Synthesephase (S-Phase) oder in der Postsynthesephase (G_2 -Phase) induziert (BOOTSMA, 1965; BOOTSMA und HUMPHREY, 1968; DOMON und RAUTH, 1968; EVANS und SCOTT, 1964, 1969; FROESE, 1966;

WATANABE et al., 1974; WHITMORE et al., 1967).

Über Zellteilungsverzögerungen nach Behandlung der Präsynthesephase (G_1 -Phase) berichten GELFANT (1963, zit. bei RIEGER und MICHAELIS, 1967), FROESE (1966), GERNER et al. (1974), HOWARD und PELC (1953), WHITMORE et al. (1967), WHEELER et al. (1970) und WATANABE et al. (1974).

Auch in dieser Arbeit wurde an menschlichen Lymphozytenkulturen gezeigt, daß die G_1 -Phase des Zellzyklus keineswegs unempfindlich gegen mutagen-induzierte Kernteilungsverzögerungen ist. Die fünf-stündige Trenimoneinwirkung während der späten G_1 -Phase verursachte eine Mitoseverzögerung von etwa 20 Stunden. Untersuchungen über eine durch das trifunktionelle Äthylenimin Trenimon in der S-Phase induzierte Kernteilungsverzögerung liegen bisher nicht vor.

Nach Trenimonbehandlung sind die meisten der stimulierten Lymphozyten erst nach 48 bis 50 Stunden Kulturdauer in der Lage, mit der DNS-Synthese zu beginnen. Die Verzögerung im DNS-Synthesebeginn beträgt demnach wie die Mitoseverzögerung etwa 20 Stunden.

Einen verzögerten Beginn der DNS-Synthese nach Einwirkung von Röntgenstrahlen in der G_1 -Phase wiesen LITTLE (1968, 1970) an menschlichen Amnionzellkulturen und GERNER et al. (1974) an synchronisierten Zellen des Chinesischen Hamsters nach. Ebenfalls an Zellen des Chinesischen Hamsters konnte TOBEY (1972) zeigen, daß Chemotherapeutika die DNS-Synthese hemmen und den Anteil der Zellen, die von der G_1 - in die S-Phase gelangen können, vermindern.

Auf welchen Mechanismen könnte der verzögerte Beginn der DNS-Synthese beruhen?

Zahlreiche Versuche haben gezeigt, daß in der G_1 -Phase des Zellzyklus spezifische Proteine gebildet werden, die bei der Initiation der DNS-Synthese eine wichtige Rolle spielen (TAYLOR, 1965; TERASIMA und YAKUSAWA, 1966; ERHAN, 1968; ERHAN et al., 1970; STEIN und BORUN, 1972; CHOE und ROSE, 1974).

Die Verzögerung des DNS-Synthesebeginns nach Trenimonbehandlung wäre folgendermaßen vorstellbar:

Trenimon induziert wie alle polyfunktionellen Äthylenimine Vernetzungen zwischen den Polynukleotidsträngen der DNS-Doppelhelix. Derartige Crosslinks könnten die Transkription der Initiatorproteine einerseits, die Replikation der DNS andererseits er-

schweren oder behindern. Erst nach Entfernung der Cross-Links würde die DNS-Synthese wieder normal ablaufen können. Der Wirkungsmechanismus bei der Auflösung der Vernetzungen ist noch ungeklärt.

Eine Beteiligung der Interstrang-Cross-Links bei mutagen-induzierten Kernteilungsverzögerungen wird schon von LAWLEY und BROOKES (1963) und LEVIS et al. (1965) vermutet.

Auch BREHAUT und FITZGERALD (1968) führen die beobachtete Hemmung der DNS-Synthese nach Cytosinarabinosid auf chromosomale Schäden zurück.

In UV-bestrahlten menschlichen Zellkulturen fanden BOOTSMA und HUMPHREY (1968) einen im Vergleich zu Kontrollzellen früheren Einbau von $^3\text{HTdR}$. Die Autoren führen die vorzeitige Thymidinmarkierung nicht auf eine Repairsynthese, sondern auf eine Verkürzung der G_1 -Phase zurück.

In dieser Arbeit fand nach Trenimonbehandlung in 15 bis 20 % der Lymphozyten in der Zeitspanne von 30 bis 36 Stunden Kulturdauer DNS-Synthese statt. Ob dieser $^3\text{HTdR}$ -Einbau als Hinweis für Reparatursynthese interpretiert werden kann, ist nach den Befunden von AINGORN und AKIFIEV (1972) zweifelhaft. Repairsynthese in PHA-stimulierten Lymphozyten kann nur nach hohen Thymidinkonzentrationen und sehr langen Expositionszeiten nachgewiesen werden. Auch bei Erfüllung dieser Voraussetzungen sind die Lymphozytenkerne nur schwach markiert.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden nur solche Kerne mit mehr als zehn Silberkörnern als markiert gewertet. Außerdem wurden die Präparate nur etwa 14 Tage exponiert. Eine Repairsynthese (unscheduled DNA synthesis) kann demnach mit unserer Versuchsanordnung nicht nachgewiesen werden.

Da AINGORN und AKIFIEV (1972) ihre Experimente aber an unbehandelten Lymphozytenkulturen durchführten, die sicher weniger Schäden reparieren müssen als solche, die einem alkylierenden Agens ausgesetzt wurden, ist es deshalb nicht ganz auszuschließen, daß das erste Synthesemaximum Zellen zuzuordnen ist, die sich in DNS-Reparatursynthese befinden.

Nach 50 Stunden Kulturdauer verläuft die DNS-Synthese kontinuierlich. Im Vergleich zu den Kontrollkulturen sind aber die pro Aufarbeitungstermin markierten Interphasekerne um ungefähr 40 % reduziert.

LISS und PALME (1964) und PALME und LISS (1965) konnten an Ehrlich-Aszites-Tumorzellen nachweisen, daß nach Trenimonbehandlung die $^3\text{HTdR}$ -Markierungsintensität der einzelnen Interphasen mit steigender Konzentration abnimmt, während der Prozentsatz der markierten Kerne fast konstant bleibt.

Eine Senkung der DNS-Syntheserate menschlicher Zellen nach Methylmethansulfonateinwirkung registrierten BUHL und REGAN (1972). Befunde an Säugerzellen zeigen, daß nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien (HAKANSSON, 1975; MAASS und KUNKEL, 1960), Methylnitrosoharnstoff (FREI und OLIVER, 1972) und UV-Strahlen (DOMON und RAUTH, 1968) die DNS-Syntheseraten vermindert werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von LISS und PALME (1964) wurde in unseren Versuchen der Prozentsatz markierter Interphasekerne nach Trenimoneinwirkung reduziert.

Dies könnte darauf beruhen, daß ein Teil der behandelten Lymphozyten so stark geschädigt wird, daß sie absterben, ohne vorher noch DNS zu synthetisieren. Die Wirkungsmechanismen, die zu einem Interphasetod (BACQ und ALEXANDER, 1961) führen können, sind noch weitgehend ungeklärt. Es ist aber naheliegend, da die Anzahl der Zellen, die in der Interphase absterben, genauso agens- und dosisabhängig ist wie induzierte chromosomale Aberrationen, einen Zusammenhang zwischen Induktion von Chromosomenaberrationen und Interphasetod zu vermuten.

In Übereinstimmung mit unseren Versuchen stellten HOFFMAN und POST (1972) an Rattenlymphozyten fest, daß nach Behandlung mit Stickstofflost die Anzahl der DNS-synthetisierenden und sich teilenden Zellen abnimmt.

Einige Autoren berichten über eine Verlängerung der S-Phase nach Einwirkung mutagener Agenzien (CHANG und ELEQUIN, 1967; FREI und OLIVER, 1972; WATANABE et al., 1974), UV-Licht (BOOTSMA und HUMPHREY, 1968) und Röntgenstrahlen (SCOTT und EVANS, 1967; BOOTSMA und LOHMAN, 1968).

In unserem Testsystem beruht die Trenimon-induzierte Mitoseverzögerung auf einer Verlängerung der G_1 -Phase des Zellzyklus um ungefähr 20 Stunden. Eine S-Phase-Verlängerung wurde nicht beobachtet: Etwa sechs Stunden nach Beginn der S-Phase treten wie in

der Kontrolle die ersten Mitosen auf. Da im Vergleich zum Kontrollversuch weniger Zellen DNS synthetisieren, liegen auch die Mitoseindices unter den Kontrollwerten.

Auch GERNER et al. (1974) weisen darauf hin, daß nach Einwirkung ionisierender Strahlen Verzögerungen nur in der G_1 - und G_2 -Phase auftreten, während die Dauer der S-Phase nicht beeinflusst wird.

Ein erster Anstieg der Häufigkeiten markierter Zellen erscheint in diesem Versuch 30 bis 36 Stunden nach Kulturbeginn. Infolgedessen würde man erste Mitosen nach einer Kulturdauer von etwa 45 Stunden erwarten. Es wurde aber erst nach 54 Stunden eine Zellteilungsfigur beobachtet.

Dieses Ergebnis könnte darauf beruhen, daß die Zellen in der G_2 -Phase des Zellzyklus blockiert werden.

Nach Trenimonbehandlung werden Ehrlich-Aszites-Tumorzellen in der G_2 -Phase angesammelt und so an der Zellteilung gehindert (GRUNICKE et al., 1975). Eine Hemmung des Zellzyklus in der Postsynthesephase nach Stickstofflosteinwirkung fanden HAMPTON (1967) an Säugerzellen, DECOSSE und GELFANT (1970), LAYDE und BASERGA (1964) an Ehrlich-Aszites-Tumorzellen, und WHEELER et al. (1970a,b) an menschlichen Zellkulturen.

Ähnliche Ergebnisse wurden nach Röntgenbestrahlung an *Vicia faba* (SCOTT und EVANS, 1967), Säugerzellen (BOOTSMA und LOHMAN, 1968; DOIDA und OKADA, 1969), menschlichen Amnionzellkulturen (LITTLE, 1970) und HeLa Zellen (BASES et al., 1975) erzielt. In einer vergleichenden Untersuchung über die Wirkung von drei Nitrosoharnstoffderivaten auf den Zellzyklus wird eine Blockierung von Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) in der G_2 -Phase beschrieben (TOBEY und CRISSMAN, 1975).

HITTELMAN und RAO (1974) untersuchten ebenfalls an CHO-Zellen die Prozesse, die zu einer Bleomycin-induzierten Zellzyklusverzögerung führen. Sie stellten fest, daß nach Bleomycin-Einwirkung weniger Zellen DNS synthetisieren und fast die Hälfte dieser Zellen in der G_2 -Phase blockiert werden. Mit Hilfe der Zellfusionstechnik fanden die Autoren an vorzeitig kondensierten G_2 -Chromosomen eine vier bis sechs mal höhere Aberrationsrate als in Mitosechromosomen. Dieser Unterschied beruht nach Ergebnissen der Autoren unter anderem darauf, daß ein Teil der induzierten Schäden schon nach kurzer Zeit repariert wird. Gelingt es allerdings nicht, die

Aberrationsrate auf ein für die Zelle erträgliches Maß zu vermindern, erfolgt eine Blockierung in der G_2 -Phase bis die Chromosomenschäden so weit reduziert sind, daß die Mitose ablaufen kann. Die Verfasser schließen aus ihren Experimenten, daß die Wahrscheinlichkeit die Mitose zu erreichen für die Zelle mit steigender Aberrationsrate abnimmt. Sie vermuten einen Schwellenwert für DNS-Schäden, der nicht überschritten werden darf, wenn eine Zellteilung ungehindert ablaufen soll.

Auch OHARA und TERASIMA (1972, zit. bei HITTELMAN und RAO, 1974) schließen aus Befunden an Mitomycin C-behandelten HeLa Zellen, daß schwere DNS-Schäden für Zellzyklusverzögerungen verantwortlich sind. Dies vermuten auch PUCK (1964) und BOOTSMAN und LOHMAN (1968).

TOBEY (1975) postuliert einen Mechanismus, der Zellen mit Chromosomendefekten während der G_2 -Phase aussortiert und deren Reparatur überwacht. Sind die Schäden behoben, kann die Zelle überleben, andernfalls stirbt sie ab.

Nach den Modellen zur Teilungskontrolle von MITCHISON (1971) können die defekten Zellen in verschiedenen Stadien der Postsynthesephase blockiert werden.

Die geschilderten Erklärungsmöglichkeiten könnten auch für die Ergebnisse dieser Arbeit zutreffen. Die verwendete Trenimonkonzentration ($0,5 \times 10^{-6}$ M) dürfte auch in G_1 so viele DNS-Schäden induziert haben, daß dadurch eine Blockierung in der G_2 -Phase des Zellzyklus erreicht wurde.

Ein möglicherweise durch Trenimon induzierter G_2 -Block könnte auch darauf beruhen, daß spezifische Proteine, die zum Ablauf der Mitose erforderlich sind, geschädigt wurden oder nicht gebildet werden konnten (DOIDA und OKADA, 1969; DONELLY und SISKEN, 1966; KOVACS und VAN'T HOF, 1972; zur Regulation des Zellzyklus GOEDEKE und RENSING, 1974).

Schon 1953 vermuteten HOWARD und PELC, daß die Induktion von Chromosomenbrüchen und Zellzyklusverzögerungen voneinander unabhängige Prozesse darstellen könnten.

Untersuchungen an Ehrlich-Aszites-Tumorzellen weisen darauf hin, daß ein durch Stickstofflost verursachter G_2 -Block nicht unmittelbar mit der Induktion von Chromosomenaberrationen zusammenhängt (DECOSSE und GELFANT, 1970). Die Verfasser erklären die G_2 -

Blockierung mit Inaktivierung von Enzymen und Beeinflussung der Proteinsynthese durch das alkylierende Agens Stickstofflost. Dagegen teilen BACCHETTI und SINCLAIR (1970) mit, daß eine durch Röntgenstrahlen verursachte Mitoseverzögerung nicht mit einer Störung der Proteinsynthese zusammenhängt.

Zur Abklärung der Frage, ob schwere Chromosomenschäden oder eine Hemmung der für die Zellteilung notwendigen Proteine zu einer möglichen G_2 -Blockierung geführt haben, wären weitere Untersuchungen, etwa der Proteinsynthese nach Trenimonbehandlung, erforderlich.

Der Verlauf der DNS-Synthese nach Trenimonbehandlung könnte auch folgendermaßen interpretiert werden:

Der Anstieg der $^3\text{HTdR}$ -Markierung im Bereich von 30 bis 36 Stunden zeigt die DNS-Synthese der ersten Population an, während die zweite Population erst nach 48 Stunden mit der DNS-Replikation beginnt.

Würde das Maximum bei 30 bis 36 Stunden der ersten Population entsprechen, sollte eine erste Mitosewelle nach 42 bis 45 Stunden Kulturdauer auftreten. Die Mitoseindices lassen aber keine Rückschlüsse auf die beiden Populationen zu, die in unbehandelten Lymphozytenkulturen zu beobachten sind (DUDIN et al., 1974; diese Arbeit); vielmehr ist eine Unterscheidung der beiden Populationen nach Trenimonbehandlung mit den hier verwendeten Methoden nicht mehr möglich.

Zellzyklus nach kombinierter Einwirkung von Trenimon und NaF (Versuch D)

Nach NaF-Einwirkung wird der Trenimon-verzögerte Zellzyklus (Versuch C) folgendermaßen verändert:

Die DNS-Synthese beginnt etwa 29 Stunden nach Kulturansatz, steigt im weiteren Verlauf kontinuierlich an und nimmt nach 55 Stunden Kulturdauer wieder leicht ab. Die maximalen Thymidineinbauraten betragen 40 % und liegen damit zwischen den Werten des Kontrollversuchs (50 %) und des Trenimonexperimentes (30 %). Obwohl schon einzelne Mitosen bei 47, 51 und 53 Stunden Kulturdauer beobachtet wurden, beginnt die eigentliche Zellteilungsaktivität wie im Trenimonversuch bei etwa 55 Stunden. Die Mitoseindices liegen etwas über den Werten nach Trenimonbehandlung.

Diese Befunde zeigen einen eindeutigen Einfluß von NaF auf den Verlauf der Trenimon-verzögerten DNS-Synthese.

Im Gegensatz dazu hat NaF auf den normalen Zellzyklus keine Wirkung (Versuch B).

Die starke Verzögerung des DNS-Synthese-Beginns nach Trenimon-Einwirkung wird durch NaF teilweise rückgängig gemacht. Möglicherweise spielt dabei die von einigen Autoren beobachtete stimulierende Wirkung des NaF auf das membrangebundene Enzym Adenylcyclase eine Rolle (BAGLIONI et al., 1972; DRUMMOND et al., 1971; KAISER et al., 1974; KORNEGAY und PENNINGTON, 1973; MENON et al., 1973; SMITH et al., 1971; PRAKASH und DHALLA, 1973; WEISS, 1969; WIKSTROEM und AGREN, 1973). Dieses Enzym, das auch bei der Lymphozytenstimulation durch PHA aktiviert wird (WHITNEY und SUTHERLAND, 1972), synthetisiert aus ATP cyclisches 3',5-AMP.

Eine Beurteilung der NaF-Wirkung auf die Entstehung von c-AMP aus ATP wird allerdings dadurch erschwert, daß NaF durch Enolasehemmung die ATP-Bildung verhindert (vgl. RICHTER, 1969).

CARLSON und SUTTIE (1966) konnten nur an schnell wachsenden HeLa Zellen eine Senkung des ATP-Spiegels nach NaF nachweisen, während der ATP-Gehalt bei normalem Wachstum unverändert blieb.

Ob NaF in unseren Lymphozytenkulturen einen Einfluß auf die ATP-Versorgung der Zellen hat, wurde nicht untersucht.

In einem Zusatzversuch konnten wir zeigen, daß NaF allein menschliche Lymphozyten nicht zu stimulieren vermag. Nach diesem Befund und dem Ergebnis, daß NaF den normalen Zellzyklus von Zwei-Tage-Lymphozytenkulturen nicht beeinflusst (Versuch B), kann ausgeschlossen werden, daß durch eine NaF-verstärkte Lymphozytenstimulierung das nach Trenimon-Einwirkung verspätete Einsetzen der DNS-Synthese teilweise ausgeglichen wird. Folglich kann auch der nach kombinierter Behandlung höhere Prozentsatz DNS-synthetisierender Zellen nicht auf einer zusätzlichen Stimulierung durch NaF beruhen.

Ein früheres Einsetzen des $^3\text{HTdR}$ -Einbaus im Kombinationsversuch könnte auch mit verstärkter Repairsynthese erklärt werden. Da NaF in der Lage ist, Adenylcyclase und Aldolase (ANDROSOV, 1968) zu stimulieren, wäre auch eine Aktivierung von Reparaturenzymen denkbar. Der Nachweis einer gesteigerten Repairsynthese dürfte auch trotz der bei Versuch C beschriebenen Vorbehalte von AINGORN und AKIFIEV (1972) möglich sein.

Für eine Reparatursynthese würde auch die Tatsache sprechen, daß die Mitosen etwa zum gleichen Zeitpunkt wie nach Trenimonbehandlung allein auftreten, obwohl nach Kombination mit NaF die DNS-Synthese-Kurve ungefähr 15 Stunden früher kontinuierlich ansteigt.

Trenimon induziert Cross-Links zwischen den Polynukleotidsträngen der DNS-Doppelhelix, die wahrscheinlich zu einer Behinderung oder Blockierung sowohl der DNS-Replikation als auch der Transkription führen.

Die Wirkung von NaF könnte nun darauf beruhen, daß entweder weniger Interstrang-Crosslinks induziert werden, oder die Auflösung der Vernetzungen erleichtert wird. Demnach würden die zur DNS-Synthese-Initiation notwendigen Proteine (CHOE und ROSE, 1974; STEIN und BORUN, 1972; TAYLOR, 1965; TERASIMA und YASUKAWA, 1966; ERHAN, 1968; ERHAN et al., 1970) wieder früher zur Verfügung stehen und die DNS-Synthese-Verzögerung könnte dadurch teilweise aufgehoben werden.

Versuche in unserem Labor an isolierter Kalbsthymus DNS sollen zeigen, ob NaF die Induktion oder die Reparatur von Crosslinks beeinflussen kann.

Auch die im Kombinationsversuch festgestellte Erhöhung der markierten Interphasekerne und der Mitoseindices weist auf eine geringere Schädigung der DNS durch NaF-Einfluß hin, so daß nach Trenimonbehandlung mehr Zellen in der Lage sind, sich nach erfolgter DNS-Replikation auch zu teilen und nicht während der Interphase absterben. Mit dieser Erklärungsmöglichkeit stehen auch einzelne früher erscheinende Mitosen in Einklang.

Über die Wirkung von NaF auf die Rate chromosomaler Aberrationen gibt Versuchsserie E der vorliegenden Arbeit Aufschluß. Diese Ergebnisse sollen aber wegen der Komplexität erst später abgehandelt werden.

Obwohl nach kombinierter Behandlung mit NaF und Trenimon die DNS-Synthese erheblich weniger verzögert wird als nach Trenimon allein, beginnt die Zellteilungsaktivität bis auf wenige Ausnahmen zum gleichen Zeitpunkt wie im Trenimonexperiment (Versuch C).

Dieser Befund könnte mit einer Verlängerung der S-Phase erklärt werden. Es wäre nach den Ergebnissen von HELUNG-LARSEN und KLENOW (1969), die eine Hemmung der DNS-Polymerase nach NaF-Einwirkung bei *Escherichia coli* nachwiesen, denkbar, daß auch in Lymphozytenkulturen infolge verminderter DNS-Polymeraseaktivität

die DNS-Synthese bei NaF-Behandlung langsamer abläuft.

Einige Autoren berichten über eine Hemmung der Proteinsynthese durch NaF (HARDESTY et al., 1973; COLOMBO et al., 1968; HEMMINKI, 1973; SAMESHIMA und IWABUCHI, 1972; SHUPPE, 1970; VESCO und COLOMBO, 1970; CHANG, 1973). Demnach könnte eine mögliche Beeinträchtigung der Synthese chromosomaler Proteine durch NaF-Einwirkung zu einer Verlängerung der S-Phase führen. Berücksichtigt man allerdings den von uns mitgeteilten Befund, daß NaF allein den normalen Zellzyklus nicht verschiebt, scheidet diese Möglichkeit der NaF-Wirkung mit hoher Wahrscheinlichkeit aus.

Andererseits könnte auch eine Blockierung in der G_2 -Phase des Zellzyklus zu diesem Ergebnis führen.

Nach unserer Vorstellung beeinflusst NaF die Induktion oder Reparatur von Crosslinks. Trotzdem könnten noch so viele DNS-Schäden erhalten bleiben, daß die Zellen in der G_2 -Phase blockiert werden. Die Möglichkeit eines G_2 -Blocks nach Trenimonbehandlung wurde bei Versuch C ausführlich dargestellt.

Die beiden Lymphozytenpopulationen (DUDIN et al., 1974; diese Arbeit) sind auch nach kombinierter Einwirkung von Trenimon und NaF im Verlauf der DNS-Synthese und der Mitosen nicht mehr zu unterscheiden.

Auf welchen Mechanismen die NaF-Wirkung beruht, kann zur Zeit noch nicht erklärt werden. Eine mögliche in vitro Wechselwirkung zwischen Trenimon und NaF, die zu einer Aktivitätsverminderung des mutagenen Agens führen könnte, wird von VOGEL (1973) ausgeschlossen, weil Trenimon in einer wässrigen Lösung sehr viel schneller mit Wasser als mit NaF reagieren würde.

Einfluß von NaF auf die Rate Trenimon-induzierter Chromatiden-aberrationen

1. NaF

Die Ergebnisse des NaF-Kontrollversuchs (F) zeigen keine Erhöhung der Raten von achromatischen Läsionen, Chromatidbrüchen und Isochromatidbrüchen gegenüber der Kontrolle (K). Translokationsfiguren wurden in diesen Versuchen nicht beobachtet. Wie wir schon 1973 (OBE und SLACIK-ERBEN) zeigten, hat NaF in der getesteten Konzentration von 10^{-3} M auf menschliche Lymphozyten keine chromosomenbrechende Wirkung. Die hier durchgeführten Experimente

unterscheiden sich von den vorhergehenden in der Kulturdauer (72 Stunden bzw. 53 Stunden), im Kulturmedium (TC 199 bzw. Ham's F 10) und in den NaF-Zugabezeiten (NaF-Zugabe: 24 Stunden vor Aufarbeitung bzw. bei Kulturbeginn).

Im Gegensatz zu den Befunden von BEEK und OBE (1974) mit Bleiaceat, ist die Wirkung von NaF auf menschliche Lymphozyten demnach nicht von der Kulturmethode abhängig.

Mit unserem Versuchsergebnis, daß NaF keine chromosomalen Aberrationen induziert, stimmen Untersuchungen von VOROSHILIN et al. (1973) an menschlichen Lymphozytenkulturen und von JAGANNATH und BHATIA (1974) und KHALATKAR et al. (1975) an Gerste überein. Dagegen erhielten BALE und HART (1973a,b) bei Gerste, HAKEEM und SHEBAB (1970) bei *Vicia faba* und MOHAMMED et al. (1966) bei *Allium cepa* Chromosomenaberrationen nach NaF-Behandlung.

Bei *Drosophila melanogaster* erhöht NaF die Frequenz von rezessiven geschlechtsgebundenen Letalfaktoren (GERDES, 1973) und die Anzahl der Individuen mit X- oder Y-Chromosomenverlust (VOGEL, 1973).

Im Gegensatz zu diesen Befunden konnten MUKHERJEE und SOBELS (1968) keine Wirkung von NaF auf reife Spermien von *Drosophila* nachweisen.

2. Trenimon

Trenimon induzierte bei fünfstündiger Einwirkung in der G₁-Phase des Zellzyklus hauptsächlich Chromatidenaberrationen wie achromatische Läsionen (AL), Chromatidbrüche (B'), Isochromatidbrüche (B''), Chromatidentranslokationen (RB') und Triradiale (RB'B''). Daneben wurden auch dizentrische Chromosomen und Ringe beobachtet. Diese Tatsache ist insofern ungewöhnlich, als chemische Agenzien normalerweise nicht in der Lage sind, Aberrationen auf chromosomaler Basis auszulösen (KIHLMAN, 1961, 1966; RIEGER und MICHAELIS, 1967).

In einer Untersuchung zum Einfluß von Trenimon auf die Chromosomen und den Generationszyklus menschlicher Lymphozyten wurde in einer Metaphaseplatte ein dizentrisches Chromosom gefunden (SPERLING, 1968). Dieser Einzelfall liegt aber durchaus im Bereich der Spontanrate. Dies trifft für unsere Ergebnisse mit dizentrischen Chromosomen und Ringen in einer Häufigkeit von 6 und 7 % nicht zu.

Es wäre daran zu denken, daß die dizentrischen Chromosomen aus asymmetrischen Chromatidentranslokationen nach einer weiteren Zellteilung entstanden sind. Diese Erklärungsmöglichkeit setzt allerdings voraus, daß sich einige Lymphozyten schon in der zweiten Mitose nach Trenimonbehandlung befinden. Die Tatsache, daß fast alle dizentrischen Chromosomen mit Fragment beobachtet wurden, spricht gegen die Entstehung aus asymmetrischen Chromatidentranslokationen, da die centromerlosen Bruchstücke während der Anaphase mit hoher Wahrscheinlichkeit verloren gehen. Die Möglichkeit, daß die dizentrischen Chromosomen aus asymmetrischen Chromatidentranslokationen der vorhergehenden Mitose gebildet wurden, ist auch nach den Ergebnissen des Zellzyklusexperiments auszuschließen. Die I-Kulturen wurden nach 65 Stunden Kulturdauer aufgearbeitet, mit einer Colcemideinwirkungszeit von neun Stunden. Da die Zellteilungsaktivität erst nach 54 Stunden Kulturdauer beginnt, können nicht innerhalb von neun bis zehn Stunden zweite Mitosen auftreten. Bei den II-Kulturen, die nach 74 Stunden Kulturdauer beendet wurden, sind jedoch vereinzelte zweite Mitosen zu erwarten. Würde die oben geschilderte Deutungsmöglichkeit für das Auftreten von dizentrischen Chromosomen zutreffen, sollten bei den I-Kulturen keine oder nur sehr wenige, bei den II-Kulturen hingegen mehr dizentrische Chromosomen auftreten. Dies ist nicht der Fall. In beiden Aufarbeitungsserien (I- und II-Kulturen) wurden Chromosomenaberrationen in gleicher Häufigkeit registriert.

Um sicherzugehen, ob in der untersuchten Zeitspanne von 56 bis 74 Stunden Kulturdauer zweite Mitosen auftreten oder nicht, wurden für eine Parallelserie des Trenimonexperiments die Mikrokernraten bestimmt. Aus azentrischen Chromatiden- und Chromosomenfragmenten, die bei der Zellteilung nicht in die Tochterkerne einbezogen wurden, können in der folgenden Interphase Mikrokerne entstehen (RIEGER und MICHAELIS, 1967; OBE et al., 1975).

Bei den gefundenen Mikrokernhäufigkeiten konnte kein Anstieg im Bereich von 23 bis 74 Stunden Kulturdauer festgestellt werden, was darauf hinweist, daß in der beobachteten Zeitspanne keine Zellen auftraten, die bereits die erste Teilung durchlaufen hatten. Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die beobachteten dizentrischen Chromosomen nicht von asymmetrischen Chromatidentranslokationen abgeleitet werden können. Die Chromosomenaberrationen müssen daher auf andere Weise entstanden sein.

In unseren Trenimonserien wurden Isochromatidbrüche am häufigsten registriert. Es wäre daher vorstellbar, daß die dizentrischen Chromosomen aus den Restchromosomen zweier Isochromatidbrüche gebildet wurden. Obwohl durchaus einige der aufgetretenen Chromosomenaberrationen so entstanden sein könnten, erscheint es uns unwahrscheinlich, daß alle registrierten dizentrischen Chromosomen so zu erklären sind, da in Arbeiten anderer Autoren (BEEK und OBE, 1974; OBE und SLACIK-ERBEN, 1973; OBE et al., 1972) nach Einwirkung von Äthylenimin auf menschliche Lymphozytenchromosomen trotz hoher Isochromatidbruchraten keine dizentrischen Chromosomen induziert wurden. Wir vermuten vielmehr, daß dieser Aberrationstyp im Gegensatz zu den Chromatidenaberrationen schon vor der DNS-Replikation am funktionell einsträngigen Chromosom entsteht. Möglicherweise werden nach Trenimonbehandlung in der G_1 -Phase des Zellzyklus regelmäßig einige Chromosomenaberrationen induziert, die aber bisher wegen ihres seltenen Auftretens nicht registriert wurden. Hinzu kommt, daß bisher ausschließlich Drei-Tage-Lymphozytenkulturen benutzt wurden, und die alkylierenden Agenzien 24 oder 32 Stunden vor Aufarbeitung zugegeben wurden. Lymphozyten, die sich während der Behandlung noch in der G_1 -Phase des Zellzyklus befanden, konnten wegen der starken Zellzyklusverzögerung (vgl. Versuch C) zu dem jeweiligen Aufarbeitungstermin nicht erfaßt werden.

3. Kombination NaF und Trenimon

Die Ergebnisse der Kombinationsversuche 1 bis 6 zeigen eine effektmindernde Wirkung des NaF. Die Raten der Chromatidbrüche, Isochromatidbrüche und Translokationen liegen mit einer Ausnahme alle unter den Werten der jeweiligen Trenimonkontrolle.

Für die achromatischen Läsionen erhielten wir dagegen nicht in allen Versuchen eine Senkung der Häufigkeiten im Vergleich zum Trenimonwert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß sich die achromatischen Läsionen von den übrigen Aberrationstypen unterscheiden. In unserer Arbeit von 1973 (OBE und SLACIK-ERBEN), in der wir die kombinierte Wirkung von NaF und Trenimon auf menschliche Drei-Tage-Lymphozytenkulturen untersuchten, erzielten wir in Bezug auf die AL ähnliche Ergebnisse.

Obwohl die achromatischen Läsionen nach Einwirkung von Röntgenstrahlen und Chemomutagenen sehr häufig sind, ist ihre Bedeutung

als Mutationsäquivalent umstritten.

SCHEID und TRAUT (1968, 1969, 1970, 1971a,b,c) untersuchten röntgeninduzierte AL bei *Vicia faba* mit UV-mikroskopischen, licht- und elektronenoptischen Methoden. Sie konnten zeigen, daß die Färbelücke von DNS- und proteinhaltigen Strängen überbrückt wird. Auch an menschlichen Lymphozyten gelang es, Chromosomenmaterial innerhalb von achromatischen Läsionen nachzuweisen (BRØGGER, 1971). In einer Arbeit über chemisch induzierte AL bei *Vicia faba* wurden mit neuen Färbemethoden die Ergebnisse von SCHEID und TRAUT und BRØGGER bestätigt (STOIAN und RAICU, 1975).

Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von Miracil D an *Drosophila* (LÜERS, 1955) und an menschlichen Lymphozytenchromosomen (OBE, 1969) weisen ebenfalls darauf hin, daß achromatische Läsionen keine Mutationsäquivalente darstellen.

Weitere Befunde von OBE (1970) in einer Arbeit über die Wirkung von Streptomycin und Dihydrostreptomycin auf menschliche Chromosomen in vitro unterstützen diese Annahme. Ebenso liefern vergleichende Untersuchungen mit p-Benzochinon an *Drosophila* und an menschlichen Lymphozyten keine Hinweise auf eine Bedeutung der AL als Mutationsäquivalente (LÜERS und OBE, 1972).

HITTELMAN und RAO (1974) untersuchten an Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters achromatische Läsionen nach Behandlung mit UV-Strahlen und alkylierenden Agenzien in vorzeitig kondensierten Chromosomen (PCC) und Mitosechromosomen. Aus ihren Ergebnissen schließen sie auf mindestens zwei verschiedene Typen von Läsionen in Mitosechromosomen. Beide beruhen auf einer veränderten DNS-Protein-Wechselwirkung im Chromatin, die zu unkondensierten Abschnitten in den Chromosomen führt, wobei die eine Form von AL schon in PCCs, die andere nur in Mitosechromosomen zu beobachten ist. Nach den genannten Autoren ist dieser zweite AL-Typ nur deshalb in Mitosechromosomen zu erkennen, weil diese wesentlich stärker kontrahiert sind als PCCs.

Alkylierende Agenzien induzieren hauptsächlich achromatische Läsionen vom zweiten Typ, während es nach Einwirkung von Röntgen- und UV-Strahlen umgekehrt ist.

Man könnte sich daher vorstellen, daß NaF vielleicht nur den ersten AL-Typ beeinflusst, dagegen aber auf den zweiten AL-Typ keine Wirkung hat. Es wäre auch denkbar, daß NaF die Induktion oder Reparatur von achromatischen Läsionen überhaupt nicht beeinflussen kann.

Ob diese Vermutung zutrifft, könnte in Experimenten mit Trenimon und NaF an vorzeitig kondensierten Chromosomen möglicherweise geklärt werden.

Die hier mitgeteilten Befunde deuten jedenfalls darauf hin, daß die achromatischen Läsionen nicht auf DNS-Schäden zurückzuführen sind, sondern als das Ergebnis gestörter Auffältelungsvorgänge während der Prophase betrachtet werden können.

Zu unseren Experimenten im Gegensatz stehen Versuche von GEBHART (1971). Aus der Tatsache, daß bei menschlichen Lymphozyten unter dem Einfluß von L-Cystein neben einer Senkung der Brüche auch eine Erniedrigung Trenimon-induzierter AL auftrat, schließt der genannte Autor, daß die AL als Mutationsäquivalent zu werten sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß unsere Versuchsergebnisse ein weiterer Hinweis für eine unterschiedliche Entstehungsweise von AL und den übrigen Chromatidenaberrationen sind.

NaF verursacht eine Senkung der Translokationen. Da Reunionsfiguren die sichtbaren Anzeichen für Repairvorgänge in der Zelle sind, könnte eine Erniedrigung dieses Aberrationstyps für eine Behinderung des Repairs sprechen.

WOLFF (1959, 1960, 1961, 1969, 1972) und WOLFF und LUIPPOLD (1955) konnten nachweisen, daß für die Knüpfung kovalenter Bindungen bei Restitution (Wiederherstellung der ursprünglichen Struktur) und Reunion (Verheilung in neuer Formation) Energie in Form von ATP erforderlich ist. Diese Tatsache wurde, aufbauend auf WOLFF's Befunden, von vielen Autoren bestätigt (BEATTY, 1957, 1959, 1962; SOBELS, 1964; ABRAHAMSON, 1959; FALK, 1959; COHN, 1958).

Experimente mit Inhibitoren der Proteinsynthese zeigten, daß bei Verheilung der Bruchflächen Peptidbindungen geknüpft werden müssen (WOLFF, 1959, 1960; BREWEN, 1963). Dies konnte auch von VOGEL und VRBA (1967), VIG et al. (1969), VIG (1971) und IWABUCHI et al. (1966) nachgewiesen werden.

Könnte NaF Repairvorgänge in der Zelle beeinflussen?

ASHBY und Mitarbeiter (1969) erreichten eine vollkommene Unterdrückung des Reparatursystems nach NaF bei Zellen des Chinesischen Hamsters. Nach Untersuchungen von CARLSON und SUTTIE (1967) senkt NaF den ATP-Spiegel in HeLa Zellen. Eine Behinderung des Repairs infolge ATP-Mangels wäre demnach denkbar.

NaF-Behandlung in Spermien von *Drosophila melanogaster* ^{erhöht} die rönt-

geninduzierte Mutationsrate (MUKHERJEE und SOBELS, 1968). Nach MUKHERJEE und SOBELS beruht dieses Ergebnis auf einer Behinderung des Repairsystems durch NaF. Auch JAGANNATH und BHATIA (1974) vermuten, daß eine Beeinflussung der Repairsynthese durch NaF zu einer Steigerung der röntgeninduzierten Mutationsrate bei Gerste geführt hat.

Könnten auch unsere Versuchsergebnisse mit gestörten Reparaturprozessen erklärt werden?

Wenn wegen einer Hemmung der Repairsynthese weniger Reunionsfiguren auftreten, würde man eine erhöhte Bruchfrequenz erwarten. Dieser Effekt wurde bei HeLa Zellen mit aktiviertem Endoxan und mit Chloramphenicol (VOGEL und VRBA, 1967) und bei menschlichen Lymphozytenchromosomen nach kombinierter Einwirkung von Daunomycin und Puromycin (VIG, 1970) beobachtet.

Im Gegensatz zu den zitierten Befunden sind in unseren Experimenten neben den Translokationen auch die Brüche und Isochromatidbrüche erniedrigt. Dieses Ergebnis kann demnach nicht mit einer Behinderung des Reunionsprozesses im Sinne von WOLFF (1955, 1959, 1960) interpretiert werden.

Ebenso kann der im Vergleich zu den Trenimonkontrollen höhere Prozentsatz ungeschädigter Metaphaseplatten in den Kombinationsversuchen nicht auf einer Hemmung der Reparaturprozesse beruhen. Auch aus den Ergebnissen des Zellzyklusexperimentes mit Trenimon und NaF (Versuch D) kann nicht auf gestörte Repairprozesse geschlossen werden. Wie schon oben ausgeführt, wäre nach diesen Befunden vielmehr eine gesteigerte Repairsynthese denkbar.

VOGEL (1973) untersuchte die NaF-Wirkung in Kombination mit dem monofunktionellen Äthylenimin A 137, dem trifunktionellen Äthylenimin Trenimon und 1-Phenyl-3,3-dimethyltriazin (PDT), einem Mutagen, das nicht zur Gruppe der Äthylenimine zählt, an *Drosophila melanogaster*. NaF senkt die induzierte Mutationsrate in Kombination mit Trenimon stark, mit PDT schwach und mit A 137 gar nicht. Da bekannt ist, daß A 137 überwiegend Punktmutationen, Trenimon dagegen hauptsächlich Chromosomenbrüche und PDT nur wenig Brüche auslöst, schließt VOGEL aus seinen Ergebnissen, daß NaF spezifisch die Induktion von Chromosomenbrüchen hemmt. VOGEL fand keine Hinweise für eine Wechselwirkung von NaF mit Reparaturprozessen. Nach NaF-Behandlung wird der Trenimon-verzögerte Zellzyklus ver-

ändert. Die bei der Abhandlung dieses Versuchs (Versuch D) entwickelte Hypothese besagte, daß die NaF-Wirkung neben einer Aktivierung von Repairenzymen auch darauf beruhen könnte, daß nach NaF entweder weniger Interstrang-Crosslinks induziert werden, oder die Auflösung von derartigen Vernetzungen erleichtert wird. Diese Deutung wird durch die unterschiedlichen Ergebnisse von VOGEL (1973) mit Trenimon und A 137, das keine Crosslinks bewirkt, gestützt.

In einer Untersuchung an menschlichen Lymphozyten konnte BRANDT (1975) zeigen, daß NaF die Röntgen-, Bleomycin- und Äthylenimin-induzierte Aberrationsrate nicht beeinflusst. Diese Befunde mit Agenzien, die keine Crosslinking-Reaktionen auslösen, stehen mit unserer Hypothese zur NaF-Wirkung in Einklang.

In dieser Arbeit sollte auch untersucht werden, in welcher Phase des Zellzyklus NaF die von Trenimon in G₁ induzierte Aberrationsrate beeinflusst.

Wie oben schon ausgeführt wurde, zeigt sich in allen NaF-Trenimon-Experimenten die Tendenz einer Senkung der Chromatidbrüche, Isochromatidbrüche und Translokationen.

Die Erniedrigung der Aberrationshäufigkeiten ist in den Versuchen NaF 0-15 (Vorbehandlung), NaF 15-20 (gleichzeitige Einwirkung mit Trenimon) und NaF 20-65 (Nachbehandlung) statistisch signifikant. Auch diese Ergebnisse können mit einer Wechselwirkung von NaF mit der chromosomalen DNS und eine daraus folgende Beeinflussung der Crosslinking-Reaktionen erklärt werden.

Diese Deutungsmöglichkeit würde vor allem bei NaF-Vorbehandlung eine stabile "DNS-NaF-Bindung", die auch nach einem Abzentrifugieren des NaF-Mediums erhalten bleibt, voraussetzen.

Die nach den Befunden des Zellzyklusexperiments (Versuch D) vermutete aktivierende NaF-Wirkung auf Repairenzyme könnte für die signifikante Erniedrigung der Aberrationsrate bei Nachbehandlung verantwortlich sein.

In allen übrigen Kombinationsversuchen wurden die Aberrationshäufigkeiten zwar tendenziell gesenkt, eine statistische Absicherung konnte aber nicht erreicht werden. Dieses Ergebnis ist besonders für die NaF-Dauerbehandlung (Versuch 6) unerwartet. Man würde normalerweise annehmen, daß ein möglicher NaF-Effekt am leichtesten nachgewiesen werden kann, wenn die Substanz von Kulturbeginn bis zur Aufarbeitung in den Blutkulturen vorhanden ist. Das

trifft auch auf den Zellzyklus nach kombinierter Einwirkung von Trenimon und NaF (Versuch D) zu. Hier wurde ein deutlicher Einfluß von NaF auf den Trenimon-verzögerten Zellzyklus beobachtet.

Der scheinbare Widerspruch zwischen den Ergebnissen aus dem Zellzyklusexperiment und den Chromosomenuntersuchungen kann folgendermaßen erklärt werden:

NaF unterdrückt einige wesentliche Schritte, die zur Entstehung von chromosomalen Aberrationen nach Einwirkung von Trenimon führen. Darüberhinaus werden möglicherweise Repairenzyme von NaF aktiviert. Diese Mechanismen der NaF-Aktivität können einerseits eine Senkung der Aberrationsrate bewirken, andererseits bei längeren Einwirkungszeiten dazu beitragen, daß Zellen, die nach Trenimonbehandlung infolge starker DNS-Schäden absterben würden, überleben können und dadurch den aberrationsmindernden Effekt des NaF verschleiern.

Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, daß in einigen Kombinationsversuchen (NaF 0-65, NaF 0-20, NaF 20-74) eine höhere Anzahl an Mehrfachtranslokationen registriert wurde.

Um genauere Aufschlüsse über das Ausmaß der NaF-Wirkung in den einzelnen NaF-Zeitvariationsversuchen erhalten zu können, wäre für jeden Versuch eine Zellzyklusanalyse erforderlich. Dies war aber in Anbetracht des hohen Arbeitsaufwandes, den derartige Analysen erfordern, hier nicht realisierbar.

Ein weiterer Gesichtspunkt muß bei der Interpretation der NaF-Kombinationsversuche berücksichtigt werden: BENDER und BREWEN (1969), STEFFEN und MICHALOWSKI (1973) und MELLO et al. (1974) berichten über Subpopulationen in menschlichen Lymphozytenkulturen, die sich in ihrer Strahlenempfindlichkeit unterscheiden. Eine dreifach höhere Translokationsrate in Mitosen der ersten Lymphozytenpopulation im Vergleich zur zweiten Population nach Einwirkung eines bifunktionellen alkylierenden Agens (A 139) in 48-Stunden-Lymphozytenkulturen fanden BEEK und OBE (1974).

Wie oben bereits mitgeteilt wurde, konnten die beiden Lymphozytenpopulationen (DUDIN et al., 1974; diese Arbeit) sowohl nach Trenimonbehandlung als auch nach kombinierter Einwirkung von Trenimon und NaF nicht mehr unterschieden werden.

Es wäre darüberhinaus vorstellbar, daß die beiden Populationen nicht nur auf ein alkylierendes Agens, sondern auch auf NaF unterschiedlich stark reagieren. Eine genaue Aussage über das Aus-

maß und die Art der NaF-Wirkung bei den einzelnen NaF-Behandlungen der Versuche 1 bis 6 ist deshalb kaum möglich.

Zusammenfassend kann über die Experimente zum Einfluß von NaF auf die Rate Trenimon-induzierter Chromatidenaberrationen folgendes gesagt werden:

NaF vermindert die Häufigkeiten von Chromatidbrüchen, Isochromatidbrüchen und Translokationen besonders deutlich, wenn NaF vor und nach der Trenimonbehandlung oder gleichzeitig mit Trenimon einwirkt. Bei den Versuchen mit längeren NaF-Behandlungszeiten wird die aberrationssenkende Wirkung durch eine höhere Überlebensrate von Zellen überdeckt, die ohne die NaF-Behandlung absterben würden.

In einer ersten Arbeit über die NaF-Wirkung bei der Auslösung chromosomaler Aberrationen mit alkylierenden Agenzien in menschlichen Lymphozytenkulturen konnten wir zeigen, daß neben einer Senkung der Chromatid- und Isochromatidbrüche die Chromatidentranslokationen in den Kombinationsserien bis zu 60 % im Vergleich zum Trenimonwert vermindert wurden (OBE und SLACIK-ERBEN, 1973). Die hier vorliegenden Ergebnisse sind, vor allem was die Versuche mit längeren NaF-Einwirkungszeiten betrifft, nicht so eindeutig. Diese Tatsache könnte auf den unterschiedlichen Kulturmethode und Behandlungszeiten beruhen.

1973 benutzten wir TC Medium 199-Blutkulturen mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Trenimon wurde jeweils 24 Stunden vor Kulturende zugegeben. Die NaF-Zugabezeiten wurden von 21 bis 27 Stunden vor Kulturabbruch variiert. Beide Substanzen wirkten bis zur Aufarbeitung der Kulturen ein.

OBE et al. (1975) untersuchten DNS-Syntheseverlauf und Mitosen in TC Medium 199-Kulturen. Sie konnten zeigen, daß die DNS-Synthese nach etwa 35 Stunden beginnt und die ersten Mitosen nach 38 bis 40 Stunden erscheinen. Höhere Mitoseindizes wurden nach 49 Stunden Kulturdauer registriert. Darüberhinaus konnten von den genannten Autoren nach 72 Stunden Kulturdauer - also zum normalen Aufarbeitungstermin für TC 199-Kulturen - 24 % erste, 46 % zweite und 30 % dritte Mitosen nachgewiesen werden. Dies würde bedeuten, daß bei einer Substanzzugabe nach 48 Stunden (entspricht 24 Stunden vor Aufarbeitung) eine bereits asynchrone Lymphozytenpopulation erfaßt wird. In die Auswertung bezieht man allerdings, be-

sonders wenn es sich um so stark zellzyklusverzögernde Substanzen wie die polyfunktionellen Alkylantien handelt, überwiegend erste Mitosen nach der Behandlung ein.

KIM (1974) registrierte in Lymphozytenkulturen mit TC Medium 199 die zweite Metaphasegeneration nach 66 Stunden Kulturdauer. Er empfiehlt daher eine Aufarbeitung spätestens zu diesem Zeitpunkt.

Es ist bekannt, daß Zellen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus unterschiedlich empfindlich auf die Einwirkung von mutagenen Agenzien reagieren (vgl. RIEGER und MICHAELIS, 1967). Diese Tatsache kann unberücksichtigt bleiben, wenn man die mutagene Wirkung nur eines Stoffes feststellen will. Bei der Untersuchung von kombinativen Effekten können dagegen erhebliche Störfaktoren auftreten. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß NaF den DNS-Syntheseverlauf beeinflußt. Es wäre demnach denkbar, daß die Schutzwirkung eines modifizierenden Agens einerseits tatsächlich auf einer Beeinflussung der Aberrationsauslösung durch ein Mutagen beruht, andererseits könnten Zellzyklusverschiebungen eine Senkung der Aberrationsrate nach kombinierter Behandlung nur vortäuschen.

Ob die starke Erniedrigung der Chromatidentranslokationen nach NaF, die mit TC 199-Kulturen nachgewiesen wurde, ganz oder teilweise auf Zellzyklusverschiebungen und Asynchronie der Lymphozytenpopulation bei Behandlungsbeginn zurückzuführen ist, ob es sich hier also nur um eine scheinbare Schutzwirkung handelt, kann nicht ohne Zellzyklusanalysen geklärt werden. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit lassen jedoch vermuten, daß NaF eine echte Schutzwirkung bei der Aberrationsauslösung durch Trenimon entfaltet.

GEBHART (1968, 1969, 1970, 1971a,b, 1973a,b) und BECHER und GEBHART (1973) untersuchten die Beeinflussung der chromosomenschädigenden Aktivität von Mutagenen (Trenimon, Myleran, 8-Hydroxychinolinsulfat) durch Radioprotektoren und Aminosäuren in menschlichen Drei-Tage-Lymphozytenkulturen. Der Nachweis einer Schutzwirkung der verschiedenen Substanzen ist mit Hilfe von TC Medium 199-Kulturen wegen der oben abgehandelten Nachteile nach unserer Meinung aber nicht eindeutig zu führen. STOSIEK und GEBHART (1974) verwendeten Ham's F 10 als Kulturmedium, inkubierten aber drei Tage und behielten auch die für TC Medium 199-Kulturen übliche Versuchsanordnung (Substanzzugabe 24 Stunden vor Aufarbeitung) bei.

Nach unveröffentlichten Befunden von DUDIN (persönliche Mitteilung) läuft die Zellteilung in Ham's F 10-Kulturen im Zeitraum von 48 bis 72 Stunden deutlich asynchron ab. Somit treten auch in der Arbeit von STOSIEK und GEBHART (1974) die oben dargestellten Probleme bei der Analyse kombinatorischer Effekte von zwei oder mehreren Substanzen auf.

Schlußbetrachtung

Die Gegenüberstellung der beiden gebräuchlichen Kulturmethoden (Ham's F 10 und TC 199) hat verdeutlicht, daß Drei-Tage-TC-Medium-199-Kulturen wegen des beobachteten asynchronen Verhaltens der Zellen zu einem sehr frühen Zeitpunkt (OBE et al., 1975) für Fragestellungen zur kombinatorischen Wirkung zweier verschiedener Substanzen nicht geeignet sind. Bei Verwendung von Ham's F 10-Kulturen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, Lymphozyten gezielt in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus mit einem Mutagen zu behandeln, vor allem auf der Basis der vorliegenden Zellzyklusexperimente in Ham's F 10-Lymphozytenkulturen (DUDIN et al., 1974; diese Arbeit). Weil hier die Lymphozyten während der ersten Zellteilung noch weitgehend synchronisiert sind, wirken sich Zellzyklusverzögerungen nach Einwirkung von Chemomutagenen besonders stark aus, und es sind deshalb Vorversuche und Zellzyklusanalysen erforderlich.

Darüberhinaus wird eine Interpretation der Ergebnisse aus den oben dargestellten Gründen (unterschiedliche Sensitivitäten der Lymphozytenpopulationen, möglicher verschiedener Einfluß eines modifizierenden Agens auf die beiden Populationen) oft so erschwert, daß die Frage, ob eine Substanz eine Schutzwirkung in Kombination mit chemischen Agenzien oder Röntgenstrahlen hat, nur nach Abwägung aller Erklärungsmöglichkeiten mit großer Vorsicht beantwortet werden kann.

Trotz dieser Schwierigkeiten haben menschliche Lymphozytenkulturen den Vorteil, daß mögliche mutagene Wirkungen direkt an den Chromosomen des Menschen getestet werden können.

Dabei können die Lymphozyten in der Kultur mit dem jeweiligen Agens behandelt werden (in vitro Test), oder es können die Chromosomen von Personen, die aus beruflichen oder therapeutischen

Gründen Schadstoffen ausgesetzt sind (in vivo Test), untersucht werden.

Da es für in vivo Tests erforderlich ist, erste Mitosen nach Stimulierung zu erfassen, sind Ham's F 10-Kulturen den TC Medium 199-Kulturen vorzuziehen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. In Ham's F 10-Lymphozytenkulturen wurde die modifizierende Wirkung von NaF auf den Zellzyklus und die Rate chromosomaler Aberrationen in Kombination mit dem Mutagen Trenimon untersucht.
Alle Experimente wurden mit dem Blut eines Blutspenders durchgeführt.
2. In unbehandelten Lymphozytenkulturen beginnt die DNS-Synthese 28 Stunden nach Kulturansatz und verläuft in der Zeitspanne bis 50 Stunden biphasisch mit Maxima bei 36 und 44 Stunden Kulturdauer. Mitosemaxima treten 42 und 48 Stunden nach Kulturbeginn auf (Versuch A).
3. Diese Ergebnisse werden als Hinweis auf zwei Lymphozytenpopulationen gewertet, die möglicherweise Unterpopulationen der T-Lymphozyten sind.
4. NaF allein beeinflusst weder die DNS-Synthesephase noch die Maxima der Mitoseindices (Versuch B).
5. Eine fünfstündige Trenimonbehandlung in der G₁-Phase des Zellzyklus (15. - 20. Stunde nach Kulturbeginn) führt dazu, daß sowohl die DNS-Synthese als auch das Auftreten von Mitosen um etwa 20 Stunden verzögert werden (Versuch C).
6. NaF verändert den Trenimon-verzögerten Zellzyklus. Die Wirkung von NaF wird besonders an einem früheren Einsetzen der DNS-Synthese und höheren ³HTdR-Einbauraten deutlich. Das Trenimon-verzögerte Auftreten von Mitosen wird durch NaF nicht beeinflusst (Versuch D).
7. Trenimon induziert in der G₁-Phase hauptsächlich Chromatidenaberrationen wie achromatische Läsionen (AL), Chromatidbrüche (B'), Isochromatidbrüche (B'') und Chromatidentranslokationen (RB'). Daneben werden auch dizentrische Chromosomen und Ringe beobachtet.
8. Im NaF-Kontrollversuch konnte keine Erhöhung der Chromatidenaberrationen im Vergleich zur Nullkontrolle festgestellt werden.
9. In Kombination mit Trenimon wirkt NaF effektmindernd.
10. Mit Ausnahme der achromatischen Läsionen zeigen die Häufigkeiten der Chromatidbrüche, Isochromatidbrüche und Translokationen eine Tendenz zur Senkung.

11. Die Erniedrigung der Trenimon-induzierten Aberrationsrate ist in den Versuchen NaF 0-15 (Vorbehandlung), NaF 15-20 (gleichzeitige Einwirkung mit Trenimon) und NaF 20-65 (Nachbehandlung) statistisch signifikant (Punkte 7 - 11: Versuch E).
12. In der Diskussion werden die Ergebnisse mit denen anderer Autoren verglichen. Es wird versucht, einen Zusammenhang zwischen der Wirkung von NaF auf den Trenimon-verzögerten Zellzyklus und auf die Rate chromosomaler Aberrationen herzustellen. Die NaF-Wirkung könnte neben einer Aktivierung von Repairenzymen auch darauf beruhen, daß nach NaF weniger Interstrang-Crosslinks induziert werden, oder deren Auflösung erleichtert wird.

VI. LITERATUR

- AINGORN, E. D., and AKIFIEV, A. P., 1972: DNA synthesis outside S-phase. 11. Autoradiographic study of ^3H -thymidine incorporation in nuclei of PHA-stimulated human lymphocytes in G_1
Genetika 8, 120 - 125
- ALBRIGHT, J. A., 1964: Inhibitory levels of fluoride on mammalian cells
Nature 203, 976
- ANDERSSON, J., MÖLLER, G., and SJÖBERG, O., 1972: Selective inhibition of DNA synthesis in T and B lymphocytes
Cellular Immunology 4, 381 - 383
- ANDROSOV, N. S., 1968: Disturbed carbohydrate-phosphate metabolism in acute sodium fluoride poisonings
Farmacol. Toksikol. 31, 243 - 246
- AOKI, Y. and MOORE, G. E., 1970: Comparative study of mitotic stages of cells derived from human peripheral blood
Exp. Cell Res. 59, 259 - 266
- ARUTUNIAN, R. M. and KULESHOV, N. P., 1972: Modification by cysteine of tiOTEF induced chromosome aberrations in cultured human leukocytes
Genetika 8, 148 - 153
- ASHBY, ROUX, R., BONTE, F. J., and BELLI, J. A., 1969: A study of some metabolic requirements for repair of sublethal irradiation damage
Radiology 93, 895 - 899
- AVANZI, S., 1961: Chromosome breakage by pyrrolizidine alkaloids and modification of the effect by cysteine
Caryologia 14, 251 - 261
- BABURINA, N. D., 1973: Cytogenetic effect of combined action of gamma-rays and nitrogen mustard gas on cells of *Crepis capillaris* during presynthesis
Tsitol. Genet. 7, 277 - 279
- BACCHETTI, S. and SINCLAIR, W. K., 1970: The relation of protein synthesis to radiation-induced division delay in Chinese Hamster cells
Radiat. Res. 44, 788 - 806

- BACQ, Z. M. and ALEXANDER, P., 1961: Fundamentals of radiobiology
Pergamon Press, Oxford
- BAGLIONI, T., DRAGOWI, G., LOCATELLI, A., and SIMONIC, T., 1972:
Intestinal adenyl cyclase activity in newborn
and adult white rats
Ital. J. Biochem. 21, 143 - 150
- BALE, S. S. and HART, G. E., 1973: Studies on the cytogenetic
effects of fluoride on barley: I. A comparative
study of the effects of sodium fluoride and
hydrofluoric acid on seedling root tips
Can. J. Genet. Cytol. 15, 695 - 702
- BALE, S. S. and HART, G. E., 1973: Studies on the cytogenetic
and genetic effects of fluoride on barley: II. The
effects of treatments of seedling coleoptiles
with sodium fluoride
Can. J. Genet. Cytol. 15, 703 - 712
- BASES, R., MENDEZ, F., HSU, K. C., and LIEBESKIND, D., 1975:
Immunoreactivity to antinucleoside antibodies
persists during G₂ arrest in X-irradiated HeLa
cells
Exp. Cell Res. 92, 505 - 509
- BAUER, K. H., 1963: Das Krebsproblem
Springer Verlag, Berlin, 795 - 796
- BAUTZ, E. and FREESE, E., 1960: On the mutagenic effects of
mutagenic agents
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 46, 1585 - 1594
- BEATTY, A. V. and BEATTY, J. W., 1959: Metabolic inhibitors and
chromosome rejoining
Amer. J. Bot. 46, 317 - 323
- BECHER, R. und GEBHART, E., 1973: Die Schutzwirkung von Cystea-
min und β -Aminoäthylisothiuronium (AET) gegen
die chromosomenschädigende Aktivität von Trenimon
in menschlichen Lymphocyten in vitro: I. Dosis-
Effekt-Beziehungen
Humangenetik 17, 307 - 316
- BEEK, B. and OBE, G., 1974: Effect of lead acetate on human
leucocyte chromosomes in vitro
Experientia 30, 1006 - 1007
- BEEK, B. and OBE, G., 1974: The human leukocyte test system
II. Different sensitivities of sub-populations

to a chemical mutagen

Mutat. Res. 24, 395 - 398

- BEEK, B. and OBE, G., 1975: The human leukocyte test system
IV. The RNA-synthesis pattern in the first G_1 -
phase of the cell cycle after stimulation with PHA
Mutat. Res. 29, 165 - 168
- BENDER, M. A., and PRESCOTT, D. M., 1962: DNA synthesis and
mitosis in culture of human peripheral leukocytes
Exp. Cell Res. 27, 221 - 229
- BENDER, M. A., and BREWEN, J. G., 1969: Factors influencing
chromosome aberration yields in the human peri-
pheral leukocyte system
Mutat. Res. 8, 383 - 399
- BERRY, R. J., 1969: Effects of fluoride on cells and tissues in
culture. A review
Fluoride Quart. Rep. 2, 157 - 167
- BISHOP, J. O., 1968: Effect of puromycin and sodium fluoride on
reticulocyte ribosomal monomers and subribosomal
particles
Arch. Biochem. Biophys. 125, 449 - 451
- BÖRTITZ, S., 1974: Bedeutung "unsichtbarer" Einflüsse indu-
strieller Immissionen auf die Vegetation
Biol. Zbl. 93, 341 - 349
- BOOTSMA, D., 1965: Changes induced in the first post-irradiation
generation cycle of human cells studied by
double labeling
Exp. Cell Res. 38, 429 - 431
- BOOTSMA, D. and HUMPHREY, R. M., 1968: The progression of
mammalian cells through the division cycle
following ultraviolet irradiation
Mutat. Res. 5, 289 - 298
- BOOTSMA, D., and LOHMAN, P. H. M., 1968: Mitotic delay after
X-irradiation of synchronized mammalian cells
cultivated in the presence of BUdR
Int. J. Radiat. Biol. 14, 69
- BOREI, H., 1945: Inhibition of cellular oxidation by fluoride
Ark. Kemi. Mineral. Geo. 20A, 1 - 215
- BRANDT, K., 1975: Untersuchungen zur kombinativen Wirkung von
Natriumfluorid mit Äthylenimin, Röntgenstrahlen
und Bleomycin auf menschliche Lymphozyten in vitro
Diplomarbeit, Freie Universität Berlin

- BREHAUT, L. A. and P. H. FITZGERALD, 1968: The effects of cytosine arabinoside on the cell cycle of cultured human leukocytes: A microdensitometric and autoradiographic study
Cell Tissue Kinet. 1, 147 - 152
- BRØGGER, A., 1971: Apparently spontaneous chromosome damage in human leukocytes and the nature of chromatid gaps
Humangenetik 13, 1 - 14
- BRUDEVOLD, F., 1966: The role of fluorides in tooth chemistry and in the prevention of dental caries
In O. EICHLER, A. FARAH, H. HERKEN, A. D. WELCH and H. A. SMITH: Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 20 Part 1.
New York, Springer Verlag 1966
- BUHL, S. N. and J. D. REGAN, 1973: DNA replication in human cells treated with methyl methanesulfonate
Mutat. Res. 18, 191 - 197
- BURNET, SIR MCFARLANE, 1973: Körpereigene und körperfremde Substanzen bei Immunprozessen
Thieme Verlag Stuttgart
- BYFIELD, P. E., STRATTON, J. A. and SMALL, R., 1974: Lymphocyte response after radiotherapy
Lancet I, 309
- CARLSON, J. R. and J. W. SUTTIE, 1967: Effects of sodium fluoride of HeLa cells. I. Growth sensitivity and adaption
Exp. Cell Res. 45, 415 - 422
- CARLSON, J. R. and J. W. SUTTIE, 1967: Effects of sodium fluoride on HeLa cells. II. Metabolic alterations associated with growth inhibition
Exp. Cell Res. 45, 423 - 432
- CARSTAIRS, K., 1962: The human small lymphocyte: its possible pluripotential quality
Lancet I 829 - 832
- CATHESIDE, D. G., 1948: Genetic effects of radiations
Advanc. Genet. 2, 271 - 358
- CHANG, T. H. and F. T. ELEQUIN, 1967: Induction of chromosome aberrations in cultured human cells by ethylenimin and its relation to the cell cycle
Mutat. Res. 4, 83 - 89

- CHANG, C. W., 1970: Effect of fluoride on ribosomes from corn roots: changes with growth retardation
Physiol. Plant 23, 536 - 543
- CHANG, C. W., 1973: Biochemical and biophysical investigation into growth and aging of corn seedlings treated with fluoride
Fluoride 6, 162 - 178
- CHEON, Y. S. and DISTEFANO, V., 1973: Effect of sodium fluoride on catecholamine concentrations in tissues from developing rats
Toxicol. Appl. Pharmacol. 24, 468 - 473
- CHOE, B.-K. and ROSE, N. R., 1974: Synthesis of DNA-binding proteins during the cell cycle of WI-38 cells
Exp. Cell Res. 83, 271 - 280
- COLOMBO, B., VESCO, C., and BAGLIONI, C., 1968: Role of ribosomal subunits in protein synthesis in mammalian cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 651 - 658
- COMMITTEE ON BIOLOGIC EFFECTS OF ATMOSPHERIC POLLUTANTS, 1971: Fluorides
National Academy of Sciences
- COOPERBAND, S. R., GREEN, J. A., KENNEDY, M. A., and GRANT, M. M., 1967: Dissociation and inhibition of the stimulatory effect of phytohemagglutinin on protein and DNA synthesis in human lymphocyte cultures
Nature 214, 1240 - 1241
- COUCH, D. B. and FRIEDMAN, M. A., 1974: Suppression of dimethylnitrosamine mutagenicity by sodium nitrite
Mutat. Res. 26, 371 - 376
- COULSON, A. S. and CHALMERS, D. G., 1964: Effects of phytohemagglutinin on leukocytes
Lancet II, 819 - 820
- CZECHOWICZ, K., OSADA, A., and SLESIAK, B., 1974: Histochemical studies on the effect of sodium fluoride on metabolism in Purkinje's cells
Folia Histochem. Cytochem. 12, 37 - 44
- DE COSSE, J. J. and GELFANT, S., 1970: Effects of nitrogen mustard during the cell cycle of the Ehrlich ascites tumor
Exp. Cell Res. 60, 185 - 190

- DE JONG, J. C., 1968: The influence of sodium fluoride on the multiplication of L cells and HeLa cells in vitro
Ned. Tijdschr. Geneesk. 112, 2266 - 2267
- DEVOTO, F. C. H., PERROTTO, B. M., BORDONI, N. E., and ARIAS, N. H. 1972: Effect of sodium fluoride on the placenta in the rat
Arch. Oral Biol. 17, 371 - 374
- DICKLER, H. B., ADKINSON, N. F., and TERRY, W. D., 1974: Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers
Nature 247, 213 - 215
- DOIDA, Y. and OKADA, 1969: Radiation-induced mitotic delay in cultured mammalian cells (L5178Y)
Radiat. Res. 38, 513 - 529
- DOMON, M. and RAUTH, A. M., 1968: Ultraviolet irradiation of mouse L cells: Effects on DNA synthesis and progression through the cell cycle
Radiat. Res. 35, 350 - 368
- DONNELLY, G. M. and SISKEN, J. E., 1967: RNA and protein synthesis required for entry of cells into mitosis and during the mitotic cycle
Exp. Cell Res. 46, 93 - 105
- DRUMMOND, G. I., SEVERSON, D. L., and DUNCAN, L., 1971: Adenyl cyclase: Kinetic properties and nature of fluoride and hormone stimulation
J. Biol. Chem. 246, 4166 - 4173
- DUDIN, G., BEEK, B., and OBE, G., 1974: The human leukocyte test system I. DNA synthesis and mitosis in PHA-stimulated 2-day-cultures
Mutat. Res. 23, 279 - 281
- ELLEGAARD, J. and DIMITROV, N. V., 1973: Ouabain-sensitive and oligomycin-sensitive adenosine-triphosphatase activities of normal human lymphocytes
Br. J. Haematol. 25, 309 - 319
- ERHAN, S., 1968: Model for DNA polymerase
Nature 219, 160 - 162
- ERHAN, S., REISHER, S., FRANKO, E. A., KAMATH, S. A., and RUTMAN, R. J., 1970: Evidence for "the Wedge", initiator of DNA replication
Nature 225, 340 - 342

- EVANS, H. J., 1962: Chromosome aberrations induced by ionizing radiations
Int. Rev. Cytol. 13, 221 - 321
- EVANS, H. J. and SCOTT, D., 1964: Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*
Genetics 49, 17 - 38
- EVANS, H. J. and SCOTT, D., 1969: The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustard and its dependence on DNA synthesis
Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B 173, 491 - 512
- FASTH, A. and BOSORBO, 1973: Protective effect of thiosulfate and metabolic thiosulfate precursors against toxicity of nitrogen mustard (HN_2)
Biochem. Pharmacol. 22, 1337 - 1351
- FEIG, S. A., SHOHET, B., and NATHAN, D. G., 1971: Energy metabolism in human erythrocytes: I. Effects of sodium fluoride
J. Clin. Invest. 50, 1731 - 1737
- FISHBEIN, L., FLAMM, W. G., and FALK, H. L., 1970: Chemical mutagens: environmental effects on biological systems
Academic Press Inc.: New York, N.Y., USA
- FREI, J. V. and OLIVER, J., 1972: Initial cell cycle delay and depression of macromolecular synthesis of primary mouse embryo cells treated with methylnitrosourea in mass culture
Exp. Cell Res. 70, 49 - 56
- FROESE, G., 1966: Division delay in HeLa cells and Chinese Hamster cells. A time lapse study
Int. J. Radiat. Biol. 10, 353 - 367
- GAUDIN, D. et al., 1971: The effect of DNA repair inhibitors on the response of tumor treated with X-ray and alkylating agents
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 202 - 206
- GEARD, C. R., 1975: Chromosomal aberrations in three successive cell cycles of *Wallabia bicolor* leukocytes after tritiated thymidine incorporation
Radiat. Res. 61, 118 - 127

- GEBHART, E., 1968: Die Wirkung von L-Cystein auf die chromatidbrechende Aktivität von 8-Hydroxychinolinsulfat
Protoplasma 65, 247 - 250
- GEBHART, E., 1969: Zur Beeinflussung der Wirkung von Myleran auf menschliche Chromosomen durch L-Cystein
Mutat. Res. 7, 254 - 257
- GEBHART, E., 1970: Die Wirkung von L-Cystein auf die Aberrationsauslösung in menschlichen Chromosomen durch chemische Mutagene I. Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei Verwendung von Trenimon als Aberrationsinduktor
Humangenetik 10, 115 - 126
- GEBHART, E., 1971: Die Wirkung von L-Cystein auf die Aberrationsauslösung in menschlichen Chromosomen durch chemische Mutagene II. Zur Bedeutung des Zeitfaktors bei Verwendung von Trenimon als Aberrationsinduktor
Humangenetik 11, 237 - 243
- GEBHART, E., 1971: Experimentelle Beiträge zum Problem der lokalen Achromasien (Gaps)
Humangenetik 13, 98 - 107
- GEBHART, E., 1971: L-Cystein als Protektor gegen die aberrationsauslösende Wirkung von 8-Hydroxychinolinsulfat in menschlichen Leukocytenchromosomen
Mutat. Res. 11, 261 - 262
- GEBHART, E., 1973: Vergleichende Untersuchungen über die Beeinflussung der chromosomenschädigenden Aktivität von 8-Hydroxychinolinsulfat in menschlichen Lymphocyten in vitro durch Radioprotektoren und Aminosäuren
Mutat. Res. 18, 353 - 361
- GEBHART, E., 1973: Untersuchungen über die Beeinflussung der chromosomenschädigenden Aktivität von Trenimon an menschlichen Lymphocyten in vitro durch Aminosäuren
Humangenetik 18, 237 - 246
- GEBHART, E., 1974: Antimutagens
Humangenetik 24, 1 - 32

- GERAGHTY, M., M. GALLER, F. SCHIFFMAN, and M. FREEDMAN, 1973:
Monoribosomal attachment to messenger ribonucleic
acid in sodium fluoride-treated rabbit reticulo-
cytes
Biochem. J. 133, 409 - 411
- GERDES, R. A., 1971: The influence of atmospheric hydrogen
fluoride on the frequency of sexlinked lethals
and sterility in *Drosophila melanogaster*
Fluoride 4, 25 - 29
- GERDES, R. A., J. D. SMITH et al., 1971: The effects of atmos-
pheric hydrogen fluoride upon *Drosophila melano-*
gaster. I. Differential genotypic response
Atmosph. Environ. 5, 113 - 116
- GERNER, E. W., R. E. MEYN, and R. M. HUMPHREY, 1974: The effect
of ionizing radiation on the kinetics of DNA
replication in synchronized Chinese hamster ovary
cells
Radiat. Res. 60, 62 - 74
- GOEDEKE, K. und RENSING, L., 1974: Regulation des Zellzyklus
Naturw. Rdsch. 27, 4 - 16
- GRUNICKE, H., F. HIRSCH, H. WOLF, U. BAUER and G. KIEFER, 1975:
Selective inhibition of thymidine transport at
low doses of the alkylating agent triethylenimino-
benzoquinone (Trenimon)
Exp. Cell Res. 90, 357 - 364
- HAKANSSON, L., 1975: Effect of cytostatic drugs on nucleic acid
synthesis in mouse thymocytes and chick embryo
cells
Arzneim. Forsch. 25, 378 - 382
- HAKEEM, H. and A. SHEBAB, 1970: Morpho-cytological studies on
the effect of sodium fluoride solutions on
Vicia faba
J. Bot. U A R 13, 9 - 27
- HAMILTON, I. R., 1969: Studies with fluoride-sensitive and
fluoride-resistant strains of *Streptococcus sali-*
varius: I. Inhibition of both intracellular poly-
glucose synthesis and degradation by fluoride
Can. J. Microbiol. 15, 1013 - 1019

- HAMILTON, I. A., 1969: Studies with fluoride-sensitive and fluoride-resistant strains of *Streptococcus salivarius*: II. Fluoride inhibition of glucose metabolism
Can. J. Microbiol. 15, 1021 - 1027
- HAMPTON, J. C., 1967: The effect of nitrogen mustard on the intestinal epithelium of the mouse
Radiat. Res. 30, 576 - 589
- HARDESTY, B., T. OBRIG, J. IRVIN, and W. CULP, 1971: The effect of sodium fluoride, edeine and cycloheximide on peptide synthesis with reticulocyte ribosomes: from gene expression and its regulation,
Proceedings of the Eleventh International Latin American Symposium, held at the University of La Plata, Argentina, November 28 - December 3, 1971
edited by F. T. KENNEY and B. A. HAMKALO, G. FAVEUKES and J. T. AUGUST
Plenum Press New York London, 1973
- HELLUNG-LARSEN, P. and H. KLENOW, 1969: On the mechanism of inhibition by fluoride ions of the DNA polymerase reaction
Biochem. Biophys. Acta 190, 434 - 441
- HEMMINKI, K., 1973: Effects of added substances on RNA and protein synthesis in immature neurons
J. Neurochem. 20, 373 - 378
- HITTELMAN, W. N. and P. N. RAO, 1974: Premature chromosome condensation: II. The nature of chromosome gaps produced by alkylating agents and ultraviolet light
Mutat. Res. 23, 259 - 266
- HITTELMAN, W. N. and P. N. RAO, 1974: Bleomycin-induced damage in prematurely condensed chromosomes and its relationship to cell cycle progression in CHO cells
Cancer Res. 34, 3433 - 3439
- HODGE, H. C. and F. A. SMITH, 1954: Some public health aspects of water fluoridation
In J. H. SHAW, Ed.: Fluoridation as a public health measure
American Association for the Advancement of Science
Publication 38, 79 - 109

- HOFFMAN, J. and POST, J., 1972: Effects of nitrogen mustard, methotrexate and hydrocortisone on cell replication in rat ileum and spleen
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 444 - 448
- HOLLAENDER, A., Chemical mutagens, principles and methods of their detection Vol I and II
New York - London, Plenum Press, 1971
Vol III, 1973
- HOLMBERG, M. and J. JONASSON, 1974: Synergistic effect of X-ray and UV-irradiation on the frequency of chromosome breakage in human lymphocytes
Mutat. Res. 23, 213 - 221
- HOWARD, A. and PELC, S. R., 1953: Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage
Heredity, London (Suppl.) 6, 261 - 273
- IWABUCHI, M., T. SAHO, and S. TANIFUJI, 1966: Studies on the factors affecting the rejoining of chromosome breaks produced by X-rays: I. Effects of mitomycin C, chloramphenicol, adenosine triphosphate, and nucleosides on the yield of X-ray induced chromosome aberrations
Jap. J. Genet. 41, 379 - 388
- JAGANNATH, D. R. and C. R. BHATIA, 1974: Effect of sodium fluoride on radiation sensitivity of barley seeds
Mutat. Res. 22, 51 - 56
- JAGIELLO, G. and JA-SHEINLIN, 1974: Sodium fluoride as a potential mutagen in mammalian eggs
Arch. Environ. Health 29, 230 - 235
- JANOSSY, G., SHOHAT, M., GREAVES, M., and DOURMASHKIN, R. R., 1973: Lymphocyte activation: IV. The ultrastructural pattern of the response of mouse T and B cells to mitogenic stimulation in vitro
Immunology 24, 211 - 227
- JASINSKA, J., J. A. STEFFEN, and A. MICHALOWSKI, 1970: Studies on in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA synthesis II. Kinetics of the initiation of the proliferative response
Exp. Cell Res. 61, 333 - 341

- JASINSKA, J., J. STEFFEN, and A. MICHALOWSKI, 1971: Human lymphocyte proliferation kinetics following stimulation with different phytohemagglutinin (PHA) concentrations in cultures synchronized by reversible DNA synthesis inhibition
Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol. 19, 37 - 42
- JERNE, N. K., 1973: The immune system
Scientific American 229, 52 - 60
- JOHANSEN, J., 1972: DNA-synthesis and distribution of first and second divisions in 72 h-cultures of human leukocytes
Experientia 28, 416 - 417
- KAISER, G., K. QUIRING, D. GAUGER, D. PALM, H. BECKER, and W. SCHOEPE, 1974: Occurrence of adenyl cyclase activity in human erythrocytes
Blut 29, 115 - 122
- KANAPKA, J. A., R. L. KHANDELWAL, and I. R. HAMILTON, 1971: Fluoride inhibition of glucose-6-phosphate formation in Streptococcus salivarius: Relation to glycogen synthesis and degradation
Arch. Biochem. Biophys. 144, 596 - 602
- KANAPKA, J. A. and J. R. HAMILTON, 1971: Fluoride inhibition of enolase activity in vivo and its relationship to the inhibition of glucose-6-phosphate formation in Streptococcus salivarius
Arch. Biochem. Biophys. 146, 167 - 174
- KAUL, B. L. and D. K. CHOUHARY, 1972: Cystein protection against ethylenimin damage in barley seeds
Radiat. Bot. 12, 57 - 61
- KHALATKAR, A. S., A. R. GOPAL-AYENGAR, and C. R. BHATIA, 1975: Modification of mutagenic efficiency of ethylmethanesulfonate with ethidium bromide, iodoacetamide and sodium fluoride in barley
Mutat. Res. 27, 331 - 340
- KHAWAJA, J. A., 1972: Influence of spermine on amino acid incorporation by free, bound and reattached ribosomes from rat liver
Acta Chem. Scand. 26, 3450- 3458

- KIHLMAN, B. A., 1961: Biochemical aspects of chromosome breakage
Advanc. Genet. 10, 1 - 59
- KIHLMAN, B. A., 1966: Actions of chemicals on dividing cells
Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey
- KIHLMAN, B. A., S. STURELID, B. HARTLEY-ASP, K. NILSSON, 1973:
Caffeine potentiation of the chromosome damage
produced in bean root tips and in Chinese hamster
cells by various chemical and physical agents
Mutat. Res. 17, 271 - 275
- KIM, MY A., 1974: Chromatidaustausch und Heterochromatinver-
änderungen menschlicher Chromosomen nach BUdR-
Markierung
Humangenetik 25, 179 - 188
- KLEIN, G., H. ALTMANN, A. WOTTAWA, und R. EBERL, 1974: Über den
Einfluß von Naproxen auf die DNS-Synthese und
DNS-Reparatur menschlicher Lymphozyten
Arzneim. Forsch. 24, 960 - 961
- KLITSUNOVA, N. V., 1967: Study of the production by Actinomycetes
of biologically active substances with a protec-
tive effect in cases of radiomimetic damages
Antibiotiki 12, 22 - 26
- KORNEGAY, P. and S. PENNINGTON, 1973: A review of the effect of
fluoride ion on adenyl cyclase
Fluoride 6, 19 - 32
- KOVACS, C. J. and J. VAN'T HOF, 1972: Changes in polysome activi-
ty related to radiation-induced mitotic delay in
synchronized root meristem cells
Radiat. Res. 49, 530 - 542
- KUKHARENKO, V. I., A. M. KULIEV, K. N. GRINBERS, and V. V.
TERSKIKH, 1974: Cell cycles in human diploid and
aneuploid strains
Humangenetik 24, 285 - 296
- LAWLEY, P. D. and BROOKES, P., 1961: Acidic dissociation of
7 : 9-dialkylguanines and its possible relation
to mutagenic properties of alkylating agents
Nature (Lond.) 192, 1081 - 1082
- LAWLEY, P. D. and BROOKES, P., 1963: The action of alkylating
agents on deoxyribonucleic acid in relation to
biological effects of the alkylating agents
Exp. Cell Res. (Suppl 9), 512 - 520

- LAWLEY, P. D., 1974: Some chemical aspects of dose-response relationships in alkylation mutagenesis
Mutat. Res. 23, 283 - 295
- LEA, D. E., 1955: Action of radiations on living cells
Second Edition, Cambridge, University Press
- LEVIS, A., G. A. DANIELI, and E. PICCINI, 1965: Nucleic acid synthesis and the mitotic cycle in mammalian cells treated with nitrogen mustard in culture
Nature 207, 608 - 610
- LEVIS, W. R. and J. H. ROBBINS, 1970: Effect of glass adherent cells on the blastogenic response of "purified" lymphocytes to phytohemagglutinin
Exp. Cell Res. 61, 153 - 158
- LIMA-DE-FARIA, A., J. REITALU, and S. BERGMAN, 1961: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of man
Hereditas 47, 695 - 704
- LITTLE, J. B., 1968: Delayed initiation of DNA synthesis in irradiated human diploid cells
Nature (Lond) 218, 1064 - 1065
- LITTLE, J. B., 1970: Irradiation of primary human amnion cell cultures: Effects on DNA synthesis and progression through the cell cycle
Radiat. Res. 44, 674 - 699
- LOEB, L. A., L. EWALD, S. S. AGARWAL, 1970: DNA-polymerase and DNA replication during lymphocyte transformation
Cancer Res. 30, 2514 - 2520
- LOVELESS, A., 1966: Genetic and allied effects of alkylating agents
Butterworths, London
- LÜERS, H., 1955: Biologisch-genetische Untersuchungen über die Wirkung eines Thioxanthonderivates an *Drosophila melanogaster*
Z. Vererbungslehre 87, 93 - 96
- LÜERS, H. und G. RÖHRBORN, 1965: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung III. Äthylenimine
Mutat. Res. 2, 29 - 44
- LÜERS, H. und G. OBE, 1972: Zur Frage einer möglichen mutagenen Wirksamkeit von p-Benzochinon
Mutat. Res. 15, 77 - 80

- MAASS, M. und H. A. KUNKEL, 1960: Biochemische Veränderungen in Tumorzellen nach Einwirkung von Röntgenstrahlen, Jodessigsäure, Wasserstoffperoxyd und Äthyleniminobenzochinon
Intern. J. Radiat. Biol. 2, 269 - 279
- MELLO, R. S., D. KWAN, and A. NORMAN, 1974: Chromosome aberrations and T-cell survival in human lymphocytes
Radiat. Res. 60, 482 - 488
- MENON, K. M. J., S. GIESE, and R. B. JAFFE, 1973: Hormone- and fluoride-sensitive adenylate cyclases in human fetal tissues
Biochem. Biophys. Acta 304, 203 - 209
- MERZ, T., 1959: The effect of extended anaerobic treatments on the chromosomes of *Vicia faba*
J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 135 - 142
- MICHAEL, R. O. and G. M. WILLIAMS, 1974: Chloroquine inhibition of repair of DNA damage induced in mammalian cells by methylmethansulfonate
Mutat. Res. 25, 391 - 396
- MICHALOWSKI, A., 1963: Time course of DNA-synthesis in human leukocyte cultures
Exp. Cell Res. 32, 609 - 612
- MILLER, D. R., W. C. DEWEY, and H. H. MILLER, 1973: X-ray-induced delay in the Chinese hamster cell-cycle: Dependence on phase irradiated under different culturing conditions, BUdR incorporation, and hypertonic treatment
Int. J. Radiat. Biol. 23, 591 - 602
- MITCHELL, B. and R. A. GERDES, 1973: Mutagenic effects of sodium and stannous fluoride upon *Drosophila melanogaster*
Fluoride 6, 113 - 117
- MITCHISON, J. M., 1971: The biology of the cell cycle
Cambridge University Press, Cambridge
- MOHAMMED, A. H., H. G. APPLGATE, and J. D. SMITH, 1966: Cytological reactions induced by sodium fluoride in *Allium cepa* root tip chromosomes
Can. J. Genetics Cytol. 8, 241 - 244

- MOUTSCHEN, J., 1958: Cysteamine as a modifier of chromosome breaks caused by maleic hydrazide in broad bean
Radiat. Res. 2, 188
- MULLER, H. J., 1954: The nature of the genetic effects produced by radiation. The manner of production of mutations by radiation
In HOLLAENDER, A., ed., Radiation Biology Vol I, Part I, Chapters 7 and 8
- MUKHERJEE, R. N. and SOBELS, F. H., 1968: The effects of sodium fluoride and iodoacetamide on mutation induction by X-irradiation in mature spermatozoa of *Drosophila*
Mutat. Res. 6, 217 - 225
- NAKAMURA, I., SEGAL, S., GLOBERSON, A., and FELDMAN, M., 1972: DNA replication as a prerequisite for the induction of primary antibody response
Cellular Immunology 4, 351 - 366
- NOWELL, P. C., 1960: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes
Cancer Res. 20, 462 - 466
- OBE, G., 1968: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung V. Vergleichende Untersuchung der Wirkung von Äthylenimin auf menschliche Leukozytenchromosomen
Mutat. Res. 6, 467 - 471
- OBE, G., 1969: Zur Wirkung von Miracil auf menschliche Leukozytenchromosomen in vitro
Mol. Gen. Genet. 103, 326 - 328
- OBE, G., 1970: Die Wirkung von Streptomycin und Dihydrostreptomycin auf menschliche Chromosomen in vitro
Mol. Gen. Genet. 107, 361 - 365
- OBE, G., SPERLING, K., und H.-J. BELITZ, 1971: Einige Aspekte zur chemischen Mutagenese beim Menschen und bei *Drosophila*
Angew. Chemie 83, 301 - 314
- OBE, G., SPERLING, K., und H.-J. BELITZ, 1972: Vergleichende Untersuchung zur Wirkung von Äthylenimin auf menschliche Leukozytenchromosomen in vitro
Arzneim.-Forsch. 22, 982 - 984

- OBE, G. and SLACIK-ERBEN, R., 1973: Suppressive activity by fluoride on the induction of chromosome aberrations in human cells with alkylating agents in vitro
Mutat. Res. 19, 369 - 371
- OBE, G., BEEK, B., VAIDYA, V. G., 1975: The human leukocyte test system III. Premature chromosome condensation from chemically and X-ray induced micronuclei
Mutat. Res. 27, 89 - 101
- OBE, G., BEEK, B., and DUDIN, G., 1975: The human leukocyte test system V. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day-cultures
Humangenetik 28, 295 - 302
- OLSSON, L. and CLAESON, M. H., 1973: Studies of subpopulations of theta-bearing lymphoid cells
Nature (New Biology) 244, 50 - 51
- OSTER, I. I., 1958: Interactions between ionizing radiation and chemical mutagens
Z. Vererbungslehre 89, 1 - 6
- PIGUET, P. F. and VASSALLI, P., 1972: Thymus-independent (B) cell proliferation in spleen cell cultures of mouse radiation chimeras stimulated by phytohemagglutinin or allogenic cells
J. Exp. Med. 136, 962 - 967
- PUCK, T. T., 1964: Phasing, mitotic delay, and chromosomal aberrations in mammalian cells
Science 144, 565 - 566
- RAUTH, A. M., 1967: Evidence for dark reactivation of ultraviolet light damage in mouse L cells
Radiat. Res. 31, 121
- RICHTER, G., 1969: Stoffwechselphysiologie der Pflanzen
Thieme Verlag
- RIEGER, R. und MICHAELIS, A., 1962: Die Auslösung von Chromosomenaberrationen bei Vicia faba durch chemische Agenzien. Eine Übersicht
Die Kulturpflanze X, 212 - 292
- RIEGER, R. und MICHAELIS, A., 1967: Die Chromosomenmutationen
VEB Fischer
- ROBERTS, J. J., STURROCK, J. E., and WARD, K. N., 1974: The

- enhancement by caffeine of alkylation-induced cell death, mutations and chromosomal aberrations in Chinese Hamster cells, as a result of inhibition of post-replication DNA repair
Mutat. Res. 26, 129 - 143
- RÖHRBORN, G., 1965: Die mutagene Wirkung von Trenimon bei der männlichen Maus
Humangenetik 1, 576 - 578
- RÖHRBORN, G. and VOGEL, F., 1969: A search for dominant mutations in F₁ progeny of male mice treated with trenimone
Humangenetik 7, 43 - 50
- ROSS, W. C. I., 1962: Biological alkylating agents
Butterworths, London
- RUKMANSKI, G., 1973: Mutability of bean induced by gamma-irradiation, ethyleneimine and some of its derivatives during separate and combined effects
Genetika 2, 14 - 20
- SABOLOVIC, D., SABOLOVIC, N., and DUMONT, F., 1972: Identification of T and B cells in mouse and man
Lancet II, 927
- SALZMAN, N. P., PELLEGRINO, M., and FRANCESCHINI, P., 1966: Biochemical changes in phytohemagglutinin (PHA) stimulated human lymphocytes
Exp. Cell Res. 44, 73 - 83
- SAMESHIMA, M., ITO, K., and IWABUCHI, M., 1972: Effect of sodium fluoride on the amount of polyribosomes, single ribosomes and ribosomal subunits in a cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*
Biochem. Biophys. Acta 281, 79 - 85
- SAMESHIMA, M., and IZAWA, M., 1975: Properties and synthesis of multiple components in native small ribosomal subunits of mouse ascites tumor cells
Biochem. Biophys. Acta 378, 405 - 414
- SCHEID, W., and TRAUT, H., 1968: Non-random distribution of X-ray-induced achromatic lesions ("gaps") in the chromosomes of *Vicia faba*
Mutat. Res. 6, 481 - 483

- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1969: The distribution of X-ray-induced achromatic lesions ("gaps") within and between the arms of the M-chromosomes of *Vicia faba*
Stud. Biophys. 17, 123 - 130
- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1970: Ultraviolet-microscopical studies on achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in the chromosomes of *Vicia faba*
Mutat. Res. 10, 159 - 161
- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1971 a: Visualisation by scanning electron microscopy of achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in chromosomes of *Vicia faba*
Mutat. Res. 11, 253 - 255
- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1971 b: Visualisation of achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in chromosomes of *Vicia faba* by staining of chromosomal proteins
Mutat. Res. 12, 97 - 99
- SCHEID, W. and TRAUT, H., 1971 c: On the nature of achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in chromosomes of *Vicia faba*
Z. Naturforsch. 26 b, 1384 - 1385
- SCHLEIERMACHER, E., 1966: Über den Einfluß von Trenimon und Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus
Humangenetik 3, 134 - 155
- SCOTT, D. and EVANS, H. J., 1967: X-ray-induced chromosomal aberrations in *Vicia faba*: Changes in response during the cell cycle
Mutat. Res. 4, 579 - 599
- SCOTT, D., 1968: The additive effect of X-rays and maleic hydrazide in inducing chromosomal aberrations at different stages of the mitotic cycle in *Vicia faba*
Mutat. Res. 5, 65 - 92
- SHAMBERGER, R. J., BAUGHMAN, F. F., KALCHERT, S. L., WILLIS, C. E., and HOFFMAN, G. C., 1973: Carcinogen-induced chromosomal breakage decreased by antioxidants
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1461 - 1463

- SHUPPE, N. G., 1970: RNA metabolism in ovarian ascites tumor cells in the presence of 2,4-dinitrophenol and sodium fluoride
Biokhimiya 35, 698 - 707
- SMITH, J. W., STEINER, A. L., NEWBERRY, W. M., Jr., and PARKER, C. W., 1971: Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in human lymphocytes: Alterations after phytohemagglutinin stimulation
J. Clin. Invest. 50, 432 - 441
- SPERLING, K., 1968: Untersuchungen zum Einfluß von Trenimon auf die Chromosomen und den Generationszyklus menschlicher Lymphocyten in vitro
Dissertation, Freie Universität Berlin, 1968
- STEEL, C. M., EVANS, J., and SMITH, M. A., 1974: Physiological variation in circulating B cell: T cell ratio in man
Nature 247, 387 - 388
- STEFFEN, J. A., and STOLZMANN, W. M., 1969: Studies on in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA-synthesis
I. Variability of S plus G₂ periods of first generation cells
Exp. Cell Res. 56, 453 - 460
- STEFFEN, J. and MICHALOWSKI, A., 1973: Heterogeneous chromosomal radiosensitivity of phytohemagglutinin stimulated human blood lymphocytes in culture
Mutat. Res. 17, 367 - 376
- STEIN, G. S. and BORUN, T. W., 1972: The synthesis of acidic chromosomal proteins during the cell cycle of HeLa S-3 cells: I. The accelerated accumulation of acidic residual nuclear protein before the initiation of DNA replication
J. Cell Biol. 52, 292 - 307
- STEVENSON, A. C., SAN ROMAN, C., and PATEL, C. R., 1973: Effects of amylobarbitone on the frequency of chromosomal aberrations in human lymphocytes determined by chlorambucil and melphalan in vitro
Mutat. Res. 19, 225 - 229

- STERNSWÄRD, J., JONDAL, M., VANKY, F., WIGZELL, H., and SEALY, R.,
1972: Lymphopenia and change in distribution of
human B and T lymphocytes in peripheral blood in-
duced by irradiation for mammary carcinoma
Lancet I, 1352 - 1356
- STOIAN, V. and RAICU, P., 1975: Morphological characteristics
and the nature of gaps (achromatic lesions) in-
duced by 4-aminouracil in chromosomes of *Vicia*
*fab*a
Mutat. Res. 28, 217 - 220
- STOSIEK, M. and GEBHART, E., 1974: Protective effect of Reducdyn^R
against the chromosome damaging activity of
2,3,5-triethyleneimino-benzoquinone-1,4 on human
lymphocytes in vitro
Humangenetik 25, 209 - 216
- SULAKHE, P. V., and DHALLA, N. S., 1973: Adenylate cyclase of
heart sarcotubular membranes
Biochem. Biophys. Acta 293, 379 - 396
- TAYLOR, E. W., 1965: Control of DNA synthesis in mammalian cells
in culture
Exp. Cell Res. 40, 316 - 332
- TERASIMA, T. and YASUKAWA, M., 1966: Synthesis of G₁ protein
preceding DNA synthesis in cultured mammalian
cells
Exp. Cell Res. 44, 669 - 671
- TOBEY, R. A., 1972: Effects of cytosine arabinoside, daunomycin,
mithramycin, azacytidine, adriamycin, and campto-
thecin on mammalian cell cycle traverse
Cancer Res. 32, 2720 - 2725
- TOBEY, R. A., 1975: Different drugs arrest cells at a number of
distinct stages in G₂
Nature 254, 245 - 247
- TOBEY, R. A. and CRISSMAN, H. A., 1975: Comparative effects of
three nitrosurea derivatives on mammalian cell
cycle progression
Cancer Res. 35, 460 - 470
- TOSK, J., 1974: Chlorpromazine protection against acridine-
induced reversion of a histidine-requiring mutant
of *Salmonella typhimurium*
Mutat. Res. 24, 1 - 3

- VALENTIN, J., 1971: Recombination in *Drosophila* after fluoride injektion
Hereditas 69, 308
- VELEMSKY, J., GICHNER, T., POKORNY, V., 1975: Caffeine enhancement of alkylating agent-induced injury in barley: its connection to DNA single-strand breaks and their repair
Mutat. Res. 28, 79 - 86
- VESCO, C. and COLOMBO, B., 1970: Effect of sodium fluoride on protein synthesis in HeLa cells: Inhibition of ribosome dissociation
J. Mol. Biol. 47, 335 - 352
- VIG, B. K., 1970: Alterations in the pattern of daunomycin-induced chromosomal aberrations by inhibitors of protein and DNA synthesis
Mutat. Res. 2, 607 - 614
- VIG, B. K., 1971: Nature of chromosome aberrations in pre-DNA-synthesis period in human leukocytes by daunomycin
Mutat. Res. 12, 441 - 452
- VIG, B. K., KONTRAS, S. B., and AUBELE, A. M., 1969: Sensitivity of G₁ phase of the mitotic cycle to chromosome aberrations induced by daunomycin
Mutat. Res. 7, 91 - 97
- VISCHER, T. L., 1972: Mitogenic factors produced by lymphocyte activation: Effect on T- and B-cells
J. Immunol. 109, 401 - 402
- VOGEL, E., 1973: Strong antimutagenic effects of fluoride on mutation induction by trenimon and 1-phenyl-3,3-dimethyltriazene in *Drosophila melanogaster*
Mutat. Res. 20, 339 - 352
- VOGEL, F. and VRBA, M., 1967: Influence of chloramphenicol on the reunion frequency of cytoxan-induced chromosome breaks in HeLa cells
Mutat. Res. 4, 874 - 875
- VOGEL, F. and RÖHRBORN, 1970: Chemical mutagenesis in mammals and man
Springer Verlag

- VOGEL, F., RÖHRBORN, G. und SCHLEIERMACHER, E., 1971: Chemisch-induzierte Mutationen bei Säuger und Mensch
Naturwissenschaften 58, 131 - 141
- VOGEL, F., RÖHRBORN, G. und HANSMANN, I., 1974: Die Testung von Fremdstoffen auf Mutagenität
Arzneim.-Forsch. 24, 1665 - 1677
- VOROSHILIN, S. I., PLOTKO, E. G., GATIYATULLINA, E. Z., and GILEVA, E. A., 1973: Cytogenetic effect of inorganic fluorine compounds on human and animal cells in vivo and in vitro
Genetika 9, 115 - 120
- WATANABE, M., TAKABE, Y., KATSUMATA, T., and TERASIMA, T., 1974: Effects of bleomycin on progression through the cell cycle of Mouse L-cells
Cancer Res. 34, 878 - 881
- WEISS, B., 1969: Similarities and differences in the norephrine- and sodium fluoride-sensitive adenylyl cyclase system
J. Pharmacol. Exp. Ther. 166, 330 - 338
- WHEELER, G. P., 1962: Studies related to the mechanisms of action of cytotoxic alkylating agents: A review
Cancer Res. 22, 651 - 688
- WHEELER, G. P., BOWDON, B. J., ADAMSON, D. J., and VAIL, M.H., 1970: Effects of certain nitrogen mustards upon the progression of cultured H. Ep. no. 2 cells through the cell cycle
Cancer Res. 30, 100 - 111
- WHEELER, G. P., BOWDON, B. J., ADAMSON, D. J., and VAIL, M. H., 1970: Effects of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurea and some chemically related compounds upon the progression of cultured H. Ep. no. 2 cells through the cell cycle
Cancer Res. 30, 1817 - 1827
- WILSON, J. D., and NOSSAL, G. J. V., 1971: Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leukaemia
Lancet II, 788 - 791

- WISEMAN, A., 1970: Effect of inorganic fluoride on enzymes
In SMITH, F. A., (Ed): Handbook of Experimental
Pharmacology, Vol. 20 Part 2 , 48 - 97
New York: Springer Verlag
- WHITMORE, G. F., TILL, J. E., and GULYAS, S., 1967: Radiation-
induced mitotic delay in L cells
Radiat. Res. 30, 155 - 171
- WHITNEY, R. B. and SUTHERLAND, R. M., 1972: Requirement of
calcium ions in lymphocyte transformation stimu-
lated by phytohemagglutinin
J. Cell Physiology 80, 329 - 338
- WIKSTROEM, B. E. and AGREN, G. K., 1973: Some properties of
adenyl cyclase from Ehrlich tumour cells
Cancer Res. 33, 2714 - 2720
- WOLFF, S. and LUIPPOLD, H. E., 1955: Metabolism and chromosome
break rejoining
Science 122, 231 - 232
- WOLFF, S., 1959: Interpretation of induced chromosome breakage
and rejoining
Radiat. Res. Suppl. I 453 - 462
- WOLFF, S., 1960: Radiation studies on the nature of chromosome
breakage
Am. Naturalist 94, 85 - 93
- WOLFF, S., 1961: Some postirradiation phenomena that affect the
induction of chromosome aberrations
J. Cellular Comp. Physiol. Suppl. I, 58, 151 - 162
- WOLFF, S., 1963: Radiation induced chromosome aberrations
Columbia University Press
- WOLFF, S., 1969: The splitting of human chromosomes into
chromatids in the absence of either DNA or
protein synthesis
Mutat. Res. 8, 207 - 214
- WOLFF, S., 1972: The repair of X-ray-induced chromosome
aberrations in stimulated and unstimulated lympho-
cytes
Mutat. Res. 15, 435 - 444

VII. TABELLEN

TABELLE 1

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes und Mitoseindices in der Kontrolle (Versuch A)

Serie a

h	N	p ₀ (%)	m	MI (%)
24	200	1,50	0,860	
26	200	7,50	1,862	
28	200	12,50	2,339	
30	200	17,00	2,656	
32	600	28,00	1,833	
34	700	31,88	1,761	
36	700	44,63	1,879	0,10
38	600	47,63	2,039	0,60
40	700	38,25	1,837	0,70
42	800	38,73	1,722	1,00
44	900	43,51	1,653	0,60
46	700	44,63	1,879	1,60
48	1000	39,00	1,542	2,10
50	600	40,38	2,003	1,00
52	600	54,63	2,032	1,60
54	200	54,50	3,521	2,00

Abkürzungen:

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl nach ihrer Markierung ausgewerteter Kerne

p₀ : markierte Interphasekerne (%)

m : mittlere Abweichung des Mittelwertes ($m = \pm \sqrt{p_0 \times (100 - p_0) / N}$)

MI : Mitoseindex (%)

für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1 000 Kerne ausgewertet

TABELLE 2

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes und Mitoseindices in der Kontrolle (Versuch A)

Serie b

h	N	p _o (%)	m	MI (%)
24	200	0,50	0,499	
26	400	1,00	0,497	
28	400	5,50	1,140	
30	400	11,75	1,610	
32	600	20,84	1,658	0,10
34	600	30,00	1,871	0,00
36	600	38,84	1,990	0,10
38	400	34,00	2,369	0,20
40	700	37,75	1,832	1,10
42	600	46,83	2,037	1,40
44	600	43,00	2,021	1,40
46	600	35,33	1,951	1,60
48	600	43,17	2,022	1,80
50	600	45,34	2,032	1,40
52	600	45,84	2,034	1,40
54	600	45,34	2,032	1,20

Abkürzungen wie bei Tabelle 1

TABELLE 3

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes und Mitoseindices in der Kontrolle (Versuch A)

Serie a+b

h	N	p ₀ (%)	m	MI (%)
24	400	1,00	0,497	
26	600	4,25	0,824	
28	600	9,00	1,168	
30	600	14,38	1,432	
32	1200	24,42	1,240	0,10
34	1300	30,94	1,282	0,00
36	1300	41,74	1,368	0,10
38	1000	40,82	1,554	0,40
40	1400	38,00	1,297	0,90
42	1400	42,78	1,322	1,20
44	1500	43,26	1,280	1,00
46	1300	39,98	1,359	1,60
48	1600	41,09	1,230	1,95
50	1200	42,86	1,429	1,20
52	1200	50,24	1,443	1,50
54	800	49,92	1,768	1,60

Abkürzungen wie bei Tabelle 1

für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 2 000 Kerne ausgewertet

TABELLE 4

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes und Mitoseindices im NaF-Versuch (Versuch B)

Serie a

h	N	p _o (%)	m	MI (%)
24	200	2,50	1,104	
26	200	5,50	1,612	
28	200	10,50	2,168	
30	200	16,00	2,592	
32	600	27,88	1,831	
34	700	44,67	1,879	
36	600	41,63	2,012	0,00
38	600	54,00	2,035	0,90
40	700	48,92	1,890	0,80
42	800	45,82	1,762	1,90
44	700	39,75	1,850	1,30
46	600	53,13	2,037	1,20
48	700	46,42	1,885	1,90
50	600	48,88	2,041	1,30
52	700	50,08	1,890	2,20
54	800	53,08	1,764	1,70

Abkürzungen wie bei Tabelle 1

TABELLE 5

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes und Mitoseindices im NaF-Versuch (Versuch B)

Serie b

h	N	p ₀ (%)	m	MI (%)
24	400	1,50	0,608	
26	400	2,25	0,742	
28	400	2,75	0,818	
30	400	8,50	1,394	
32	600	12,83	1,365	
34	600	21,50	1,677	0,10
36	600	37,83	1,980	0,20
38	600	46,00	2,035	0,50
40	600	46,67	2,037	0,60
42	700	37,33	1,828	1,40
44	600	43,00	2,021	0,90
46	600	43,15	2,022	1,90
48	600	32,00	1,904	1,50
50	500	36,00	2,147	1,60
52	600	44,50	2,029	1,70
54	500	49,20	2,236	1,60

Abkürzungen wie bei Tabelle 1

TABELLE 6

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes und Mitoseindices im NaF-Versuch (Versuch B)

Serie a+b

n	N	p ₀ (%)	m	MI (%)
24	600	2,00	0,572	
26	600	3,86	0,786	
28	600	6,63	1,016	
30	600	12,25	1,338	
32	1200	20,36	1,162	
34	1300	33,09	1,305	0,10
36	1200	39,73	1,413	0,10
38	1200	50,00	1,443	0,70
40	1300	47,80	1,385	0,70
42	1500	41,58	1,273	1,65
44	1300	41,38	1,366	1,10
46	1200	48,14	1,442	1,55
48	1300	39,21	1,354	1,70
50	1100	42,44	1,490	1,45
52	1300	47,29	1,385	1,95
54	1300	51,14	1,386	1,65

Abkürzungen wie bei Tabelle 1

für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 2 000 Kerne ausgewertet

TABELLE 7

Gegenüberstellung der DNS-Synthese- und Mitosemaxima aus Kontroll- (Versuch A) und NaF-Serien (Versuch B)

Versuch	DNS-Synthese				Mitoseindex			
	<u>1. Maximum</u>		<u>2. Maximum</u>		<u>1. Maximum</u>		<u>2. Maximum</u>	
	h	%	h	%	h	%	h	%
KO a	38	47,63	46	44,63	42	1,00	48	2,10
	b	36	38,84	42	46,83	42	1,40	48
NaF a	38	54,00	46	53,13	42	1,90	48	1,90
	b	40	46,67	46	43,15	42	1,40	46
KO a+b	36	41,74	44	43,26	42	1,20	48	1,95
NaF a+b	38	50,00	46	48,14	42	1,65	48	1,70

TABELLE 8

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes und Mitoseindices im Trenimon-Versuch (Versuch C)

Serie a

h	N	p _o (%)	m	MI (%)
23	400	1,17	0,538	
24	400	1,75	0,656	
25	400	3,50	0,919	
26	600	6,50	1,006	
27	300	5,33	1,297	
28	300	4,66	1,217	
29	600	1,33	0,468	
30	300	7,33	1,505	
31	600	7,33	1,064	
32	500	8,60	1,254	
33	600	20,50	1,648	
34	600	14,33	1,430	
35	600	1,66	0,522	
36	600	9,00	1,168	
37	400	3,67	0,940	
38	500	2,17	0,652	
39	600	2,17	0,595	
40	600	8,67	1,149	
41	300	0,66	0,467	
42	300	1,66	0,738	
43	600	1,16	0,437	
44	600	2,67	0,658	
45	600	5,50	0,931	
46	600	4,17	0,816	
47	600	1,83	0,547	0,00
48	600	2,00	0,572	
49	600	17,83	1,563	0,00
50	600	3,33	0,732	

TABELLE 8 -Fortsetzung

h	N	P ₀ (%)	m	MI (%)
51	600	20,50	1,648	0,00
52	600	26,00	1,791	0,00
53	600	25,00	1,768	0,00
54	600	26,33	1,798	0,10
55	600	26,83	1,809	0,10
56	600	15,33	1,471	0,10
57	600	20,50	1,648	0,20
58	600	27,33	1,819	0,00
59	600	25,16	1,772	0,20
60	600	22,17	1,696	0,40
61	600	27,67	1,826	0,40
62	600	14,83	1,451	0,30
63	600	27,33	1,819	0,10
64	600	27,00	1,812	0,00
65	600	25,00	1,768	0,30
66	600	27,67	1,826	0,40
67	1000	26,70	1,399	0,10
68	600	21,83	1,686	0,30
69	600	20,50	1,648	0,40
70	600	21,50	1,677	0,40
71	600	18,83	1,596	0,50
72	1000	21,00	1,288	0,20
73	1000	19,10	1,243	0,40
74	1000	21,50	1,299	0,90

Abkürzungen wie bei Tabelle 1

TABELLE 9

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes und Mitoseindices im Trenimon-Versuch (Versuch C)

Serie b

h	N	P ₀ (%)	m	MI (%)
23	500	5,41	1,012	
24	500	5,00	0,975	
25	600	5,33	0,917	
26	600	4,83	0,875	
27	400	7,00	1,276	
28	600	2,83	0,677	
29	600	2,00	0,572	
30	600	4,16	0,815	
31	600	9,00	1,168	
32	600	9,66	1,206	
33	600	12,33	1,342	
34	600	14,33	1,430	
35	600	9,83	1,215	
36	600	17,66	1,557	
37	600	3,66	0,767	
38	600	2,16	0,593	
39	600	1,33	0,468	
40	600	2,45	0,631	
41	600	2,16	0,593	
42	600	1,33	0,468	
43	600	2,16	0,593	
44	600	0,66	0,331	
45	600	1,66	0,522	
46	600	2,83	0,677	
47	600	2,16	0,593	0,00
48	600	1,16	0,437	
49	600	2,33	0,616	0,00
50	600	1,45	0,488	

TABELLE 9 -Fortsetzung

h	N	p ₀ (%)	m	MI (%)
51	600	21,50	1,677	0,00
52	600	25,66	1,783	0,00
53	600	21,33	1,672	0,00
54	600	24,50	1,756	0,10
55	600	19,83	1,628	0,10
56	600	17,16	1,539	0,10
57	600	23,66	1,735	0,20
58	600	19,00	1,602	0,00
59	600	21,16	1,667	0,20
60	600	15,83	1,490	0,40
61	600	28,00	1,833	0,40
62	600	10,16	1,233	0,30
63	600	25,16	1,772	0,10
64	600	28,00	1,833	0,00
65	600	22,50	1,705	0,30
66	600	19,50	1,617	0,40
67	600	18,83	1,596	0,10
68	600	18,50	1,585	0,30
69	600	15,83	1,490	0,40
70	600	17,16	1,539	0,40
71	600	19,66	1,622	0,50
72	600	19,83	1,628	0,20
73	600	16,66	1,521	0,40
74	700	21,12	1,543	0,90

Abkürzungen wie bei Tabelle 1

TABELLE 10

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes und Mitoseindices im Kombinationsversuch (Versuch D)

Serie a

h	N	p _o (%)	m	MI (%)
23	600	0,33	0,234	
24	600	0,16	0,163	
25	600	0,66	0,331	
26	600	0,50	0,288	
27	600	2,33	0,616	
28	600	1,00	0,406	
29	600	3,83	0,784	
30	600	2,50	0,637	
31	600	10,00	1,225	
32	600	3,83	0,784	
33	600	7,83	1,097	
34	600	8,33	1,128	
35	600	17,33	1,545	
36	600	12,50	1,350	
37	600	12,33	1,342	
38	600	13,33	1,388	
39	600	14,50	1,437	
40	600	13,33	1,388	
41	600	21,83	1,686	0,00
42	600	18,50	1,585	0,00
43	600	23,00	1,718	0,00
44	600	18,33	1,580	0,00
45	600	23,83	1,739	0,00
46	600	19,83	1,628	0,00
47	600	23,66	1,735	0,00
48	600	27,00	1,812	0,00
49	600	33,83	1,932	0,00
50	600	21,00	1,663	0,00

TABELLE 10 -Fortsetzung

h	N	p ₀ (%)	m	MI (%)
51	600	20,85	1,809	0,00
52	600	20,83	1,809	0,00
53	600	29,66	1,863	0,00
54	600	35,66	1,955	0,00
55	600	35,33	1,951	0,40
56	600	36,66	1,967	0,00
57	600	22,33	1,700	0,00
58	600	27,50	1,823	0,00
59	600	40,66	2,005	0,40
60	600	26,66	1,805	0,10
61	600	32,66	1,915	0,10
62	600	29,50	1,862	0,40
63	600	29,16	1,855	0,20
64	600	31,50	1,896	0,30
65	600	24,83	1,764	0,10
66	600	23,33	1,727	0,40
67	600	30,16	1,874	0,60
68	600	30,50	1,880	0,60
69	600	28,50	1,843	0,10
70	600	23,33	1,727	0,30
71	600	25,66	1,735	0,70
72	600	27,66	1,826	0,70
73	600	27,83	1,830	0,30
74	600	25,83	1,787	0,30

Abkürzungen wie bei Tabelle 1

TABELLE 11

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes und Mitoseindices im Kombinationsversuch (Versuch D)

Serie b

h	N	p ₀ (%)	m	MI (%)
23	600	0,33	0,234	
24	600	1,16	0,437	
25	600	0,66	0,331	
26	600	0,16	0,163	
27	600	2,00	0,572	
28	600	2,16	0,593	
29	600	5,83	0,957	
30	600	3,50	0,750	
31	600	10,50	1,251	
32	600	4,66	0,861	
33	600	15,50	1,477	
34	600	9,00	1,168	
35	600	20,83	1,659	
36	600	14,16	1,423	
37	600	12,83	1,365	
38	600	12,33	1,342	
39	600	19,50	1,617	
40	600	12,33	1,342	
41	600	21,50	1,677	0,00
42	600	15,33	1,471	0,00
43	600	20,50	1,648	0,00
44	600	19,33	1,612	0,00
45	600	21,16	1,667	0,00
46	600	16,16	1,503	0,00
47	600	31,50	1,896	0,20
48	600	26,16	1,794	0,00
49	600	28,83	1,850	0,00
50	600	23,83	1,739	0,00

TABELLE 11 -Fortsetzung

h	N	p ₀ (%)	m	MI (%)
51	600	28,16	1,836	0,10
52	600	30,33	1,877	0,00
53	600	29,33	1,859	0,10
54	600	34,33	1,938	0,00
55	600	32,16	1,907	0,30
56	600	34,83	1,945	0,30
57	600	24,66	1,760	0,20
58	600	23,50	1,731	0,20
59	600	35,16	1,950	0,70
60	600	30,83	1,885	0,30
61	600	29,50	1,862	0,20
62	600	30,50	1,880	0,20
63	600	32,66	1,915	0,20
64	600	32,83	1,917	0,50
65	600	26,33	1,798	0,30
66	600	25,16	1,772	0,50
67	600	23,66	1,735	0,40
68	600	29,33	1,859	0,50
69	600	24,83	1,764	0,20
70	600	22,33	1,700	0,40
71	600	21,00	1,663	0,60
72	600	27,50	1,823	0,40
73	600	23,83	1,739	0,10
74	600	31,33	1,894	0,90

Abkürzungen wie bei Tabelle 1

TABELLE 12

Mikrokernrate im Trenimon-Versuch (Versuch C)

Serie b

h	N	<u>Mikrokerne</u>	
		abs.	%
23	500	1	0,20
24	500	1	0,20
25	600	0	0,00
26	600	3	0,50
27	400	0	0,00
28	600	0	0,00
29	600	3	0,50
30	600	1	0,17
31	600	2	0,33
32	600	4	0,67
33	600	4	0,67
34	600	3	0,50
35	600	5	0,83
36	600	3	0,50
37	600	1	0,17
38	600	5	0,83
39	600	5	0,83
40	600	1	0,17
41	600	2	0,33
42	600	2	0,33
43	600	2	0,33
44	600	6	1,00
45	600	1	0,17
46	600	1	0,17
47	600	5	0,83
48	1300	4	0,31
49	1300	4	0,31
50	1300	1	0,08

TABELLE 12 -Fortsetzung

h	N	<u>Mikrokerne</u>	
		abs.	%
51	1300	6	0,46
52	1300	1	0,08
53	1300	3	0,13
54	1300	4	0,31
55	1300	6	0,46
56	1300	4	0,31
57	1300	2	0,15
58	1300	2	0,15
59	1300	5	0,38
60	1300	4	0,31
61	1300	2	0,15
62	1300	5	0,38
63	1300	3	0,23
64	1300	3	0,23
65	1300	4	0,31
66	1300	6	0,46
67	1300	5	0,38
68	1300	7	0,54
69	1300	5	0,38
70	1300	5	0,38
71	1000	3	0,30
72	1300	3	0,23
73	1300	6	0,46
74	-	-	-

Abkürzungen:

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Interphasekerne

abs. : absolute Anzahl Mikrokerne

TABELLE 13

Mikrokernrate nach kombinierter Einwirkung von Trenimon und NaF
(Versuch D)

h	Serie a			Serie b		
	N	<u>Mikrokerne</u> abs.	%	N	<u>Mikrokerne</u> abs.	%
23	600	1	0,17	600	2	0,33
24	-	-	-	600	5	0,83
25	600	0	0,00	600	0	0,00
26	600	0	0,00	600	3	0,50
27	600	1	0,17	600	2	0,33
28	600	3	0,50	600	2	0,33
29	600	0	0,00	600	1	0,17
30	600	2	0,33	600	1	0,17
31	600	0	0,00	600	1	0,17
32	600	2	0,33	600	1	0,17
33	600	0	0,00	600	0	0,00
34	600	1	0,17	600	4	0,67
35	600	0	0,00	600	1	0,17
36	600	0	0,00	600	2	0,33
37	600	1	0,17	600	3	0,50
38	600	1	0,17	600	2	0,33
39	600	0	0,00	600	1	0,17
40	600	0	0,00	600	3	0,50
41	1000	1	0,10	1000	1	0,10
42	600	1	0,17	1300	2	0,15
43	1300	1	0,08	1100	1	0,09
44	1300	1	0,08	1100	3	0,27
45	1300	3	0,23	1000	1	0,10
46	1300	2	0,15	1300	5	0,38
47	1300	2	0,15	1300	2	0,15
48	1300	1	0,08	1300	1	0,08
49	1000	1	0,10	1300	3	0,23
50	1300	3	0,23	1300	1	0,08

TABELLE 13 -Fortsetzung

h	Serie a			Serie b		
	N	<u>Mikrokerne</u>		N	<u>Mikrokerne</u>	
		abs.	%		abs.	%
51	1300	0	0,00	1000	1	0,08
52	1300	1	0,08	1300	4	0,31
53	1300	2	0,15	1300	3	0,23
54	1300	1	0,08	1300	2	0,15
55	1300	0	0,00	1300	2	0,15
56	1300	0	0,00	1300	0	0,00
57	1300	4	0,31	1300	4	0,31
58	1300	2	0,15	1300	1	0,08
59	1300	1	0,08	1300	1	0,08
60	1300	2	0,15	1300	2	0,15
61	1300	3	0,23	1100	0	0,00
62	1000	0	0,00	1300	3	0,23
63	1300	1	0,08	1300	1	0,08
64	1300	1	0,08	1300	1	0,08
65	1300	1	0,08	1300	2	0,15
66	1300	1	0,08	1300	3	0,23
67	1300	1	0,08	1000	1	0,10
68	1300	1	0,08	1300	0	0,00
69	1300	0	0,00	1300	2	0,15
70	1300	4	0,31	1300	4	0,31
71	1300	3	0,23	1300	0	0,00
72	1300	2	0,15	1300	1	0,08
73	1000	3	0,30	1000	0	0,00
74	1300	3	0,23	1300	4	0,31

Abkürzungen wie bei Tabelle 12

TABELLE 14

Versuch E

Häufigkeiten von achromatischen Läsionen (AL), Chromatidbrüchen (B') und Isochromatidbrüchen (B'') in Nullkontrolle (K) und NaF-Kontrolle (F)

	AL		B'		B''	
	%	pro Zelle	%	pro Zelle	%	pro Zelle
K ^a	9,50	0,105	4,50	0,045	1,00	0,010
F ^b	10,66	0,123	5,00	0,050	0,33	0,003

a) 2 Kulturen, 200 Metaphaseplatten

b) 3 Kulturen, 300 Metaphaseplatten

TABELLE 15

Häufigkeiten von achromatischen Läsionen (AL), Chromatidbrüchen (B^I), Isochromatidbrüchen (B^{II}) und Translokationen (RB^I) in den I-Kulturen von Trenimonkontrolle und Kombinationsversuchen (Versuch E)

Abkürzungen der Versuchsserien siehe Material und Methode (siehe Versuchsschema auf Seite 26)

für alle Versuche gilt: 2 Kulturen, 200 Metaphaseplatten

wenn $P \leq 0,05$: der aufgetretene Unterschied zwischen der Trenimonkontrolle und dem jeweiligen Kombinationsversuch ist statistisch signifikant

TABELLE 15

	Treko I	NaF 15-20 I	NaF 0-15 I	NaF 0-20 I	NaF 20-65 I	NaF 15-65 I	NaF 0-65 I
AL	%	24,00	15,50	21,50	14,00	19,00	27,50
	pro Zelle	0,375	0,230	0,285	0,230	0,310	0,485
	P	0,03	0,06	0,56	0,01	0,22	0,40
B'	%	29,50	22,50	19,50	22,00	24,50	24,50
	pro Zelle	0,340	0,275	0,215	0,270	0,280	0,290
	P	0,11	0,02	0,02	0,085	0,26	0,26
B''	%	31,50	19,50	25,50	20,50	30,50	27,50
	pro Zelle	0,400	0,205	0,310	0,230	0,375	0,360
	P	0,006	0,004	0,18	0,012	0,82	0,37
RB'	%	15,00	9,00	12,00	8,50	15,50	13,50
	pro Zelle	0,195	0,095	0,140	0,100	0,180	0,180
	P	0,065	0,125	0,38	0,045	0,88	0,67

TABELLE 16

Häufigkeiten von achromatischen Läsionen (AL), Chromatidbrüchen (B'), Isochromatidbrüchen (B'') und Translokationen (RB') in den II-Kulturen von Trenimonkontrolle und Kombinationsversuchen (Versuch E)

Abkürzungen der Versuchsserien siehe Material und Methode (siehe Versuchsschema auf Seite 26)

a) 3 Kulturen, 300 Metaphaseplatten; für alle übrigen Versuche gilt : 2 Kulturen, 200 Metaphaseplatten

wenn $P \leq 0,05$: der aufgetretene Unterschied zwischen der Trenimonkontrolle und dem jeweiligen Kombinationsversuch ist statistisch signifikant

TABELLE 16

	Treko II	NaF 15-20 II	NaF 0-15 II	NaF 0-20 II	NaF 20-74 II	NaF 15-74 II	NaF ^d 0-74 II
AL	% 18,50 0,240	11,50 0,145 0,05	15,50 0,205 0,42	18,00 0,245 0,884	20,00 0,275 0,75	23,00 0,335 0,26	22,00 0,286 0,34
B'	% 26,50 0,315	20,50 0,235 0,16	16,50 0,185 0,015	19,00 0,250 0,075	21,00 0,265 0,20	27,50 0,315 0,82	24,00 0,273 0,52
B''	% 28,00 0,360	22,00 0,240 0,17	18,00 0,180 0,017	20,00 0,290 0,06	20,50 0,265 0,08	25,00 0,340 0,50	21,00 0,266 0,07
RB'	% 13,00 0,175	6,00 0,065 0,016	7,00 0,080 0,045	14,00 0,165 0,76	8,50 0,095 0,14	11,00 0,110 0,54	10,06 0,134 0,02

TABELLE 17

Häufigkeiten von achromatischen Läsionen (AL), Chromatidbrüchen (B'), Isochromatidbrüchen (B'') und Translokationen (RB') in den Kulturen I+II von Trenimonkontrolle und Kombinationsversuchen (Versuch E)

Abkürzungen der Versuchsserien siehe Material und Methode (siehe Versuchsschema auf Seite 26)

a) 5 Kulturen, 500 Metaphaseplatten; für alle übrigen Versuche gilt : 4 Kulturen, 400 Metaphaseplatten

wenn $P \leq 0,05$: der aufgetretene Unterschied zwischen der Trenimonkontrolle und dem jeweiligen Kombinationsversuch ist statistisch signifikant

TABELLE 17

	Treko	I+II	NaF	15-20	I+II	NaF	0-15	I+II	NaF	0-20	I+II	NaF	20-74	I+II	NaF	15-74	I+II	NaF ^a
AL																		
%	21,25			13,50			16,00			19,75			17,00			21,00		24,20
pro Zelle	0,307			0,187			0,205			0,265			0,252			0,322		0,366
P				0,0038			0,055			0,6			0,12			0,92		0,3
B'																		
%	28,00			21,50			18,00			19,25			21,50			26,00		24,20
pro Zelle	0,327			0,255			0,210			0,232			0,267			0,297		0,280
P				0,033			0,0008			0,0035			0,03			0,52		0,2
B''																		
%	29,75			20,75			17,25			22,75			20,50			27,75		23,60
pro Zelle	0,380			0,222			0,185			0,300			0,247			0,357		0,304
P				0,0035			0,00003			0,025			0,0027			0,53		0,035
RB'																		
%	14,00			7,50			8,50			13,00			8,50			13,25		11,80
pro Zelle	0,180			0,080			0,092			0,152			0,097			0,145		0,152
P				0,003			0,013			0,68			0,014			0,76		0,32

TABELLE 18

Summen der Bruchereignisse pro Zelle und Prozentsätze ungeschädigter Metaphaseplatten in Trenimonkontrollen und Kombinationsexperimenten (Versuch E)

	Summe der Bruchereignisse pro Zelle ^a	ungesch. Metaphaseplatten %	P ^b
Treko I	1,510	28,50	
NaF 15-20 I	0,875	45,50	0,0007
NaF 0-15 I	0,825	49,00	0,00003
NaF 0-20 I	1,115	42,00	0,005
NaF 20-65 I	0,930	49,00	0,0003
NaF 15-65 I	1,390	37,50	0,051
NaF 0-65 I	1,370	36,00	0,11
Treko II	1,385	35,00	
NaF 15-20 II	0,845	52,50	0,0004
NaF 0-15 II	0,705	53,00	0,00028
NaF 0-20 II	1,160	50,00	0,0025
NaF 20-74 II	0,985	48,50	0,006
NaF 15-74 II	1,215	37,00	0,68
NaF 0-74 II	1,071	41,33	0,045

Abkürzungen der Versuchsserien siehe Material und Methode (siehe Versuchsschema auf Seite 26)

a) kalkuliert aus: $B' = 1$

$B'' = 2$

$RB' = 2$

b) $P \leq 0,5$: der aufgetretene Unterschied zwischen Trenimonkontrolle und dem jeweiligen Kombinationsversuch ist statistisch signifikant

Anzahl der Chromatidentranslokationen (RB') aus zwei und mehr Chromosomen, der Triradiale (RB'B'), der dizentrischen Chromosomen (DIZ) und der Ringe in Trenimonkontrollen und Kombinationsversuchen (Versuch E)

	RB' (2)	RB' (3)	RB' (4)	RB' (5)	RB'B'	DIZ + Fr.	DIZ o. Fr.	Ringe
Treko I	25	2	-	1	4	5	-	2
NaF 15-20 I	16	-	-	-	3	-	-	-
NaF 0-15 I	16	-	-	-	2	1	2	-
NaF 0-20 I	21	-	-	-	-	3	2	1
NaF 20-65 I	17	-	-	-	1	2	-	-
NaF 15-65	27	1	-	-	5	2	1	-
NaF 0-65 I	24	5	-	-	4	3	-	-
Treko II	22	1	-	-	6	5	-	1
NaF 15-20 II	10	-	-	-	-	3	-	-
NaF 0-15 II	8	1	-	-	-	4	3	-
NaF 0-20 II	18	4	-	-	1	8	2	-
NaF 20-74 II	9	1	2	-	2	2	3	-
NaF 15-74 II	12	1	-	-	4	3	2	-
NaF 0-74 II	24	2	-	-	5	8	1	-

Abkürzungen der Versuchsserien siehe Material und Methode

TABELLE 20

Klassenhäufigkeiten der achromatischen Läsionen (AL) in Trenimonkontrollen und Kombinationsversuchen (Versuch E)

Serie	Klasse	0	1	2	3	4	≥5
Treko I		152	26	18	3	1	0
NaF 15-20 I		169	19	9	3	0	0
NaF 0-15 I		167	25	8	0	0	0
NaF 0-20 I		158	30	10	2	0	0
NaF 20-65 I		172	21	5	0	0	2
NaF 15-65 I		162	23	9	4	1	1
NaF 0-65 I		145	32	14	4	2	3
Treko II		163	27	9	1	0	0
NaF 15-20 II		177	17	6	0	0	0
NaF 0-15 II		169	21	10	0	0	0
NaF 0-20 II		164	24	11	1	0	0
NaF 20-74 II		160	30	7	1	2	0
NaF 15-74 II		154	29	13	4	0	0
NaF 0-74 II		234	53	8	4	0	1

Abkürzungen der Versuchsserien siehe Material und Methode
(siehe Versuchsschema auf Seite 26)

TABELLE 21

Klassenhäufigkeiten der Chromatidbrüche (B') in Trenimonkontrollen und Kombinationsversuchen (Versuch E)

Serie	Klasse	0	1	2	3	4	≥5
Treko I		141	50	9	0	0	0
NaF 15-20 I		155	40	4	0	0	0
NaF 0-15 I		161	31	8	0	0	0
NaF 0-20 I		161	36	2	1	0	0
NaF 20-65 I		156	36	6	2	0	0
NaF 15-65 I		151	43	5	1	0	0
NaF 0-65 I		151	41	7	1	0	0

Treko II		147	46	4	3	0	0
NaF 15-20 II		159	35	6	0	0	0
NaF 0-15 II		167	29	4	0	0	0
NaF 0-20 II		162	30	7	0	0	1
NaF 20-74 II		158	37	2	1	1	1
NaF 15-74 II		145	48	6	1	0	0
NaF 0-74 II		228	64	7	0	1	0

Abkürzungen der Versuchsserien siehe Material und Methode
(siehe Versuchsschema auf Seite 26)

TABELLE 22

Klassenhäufigkeiten der Isochromatidbrüche (B¹¹) in Trenimonkontrollen und Kombinationsversuchen (Versuch E)

Serie	Klasse	0	1	2	3	4	≥5
Treko I		137	48	13	2	0	0
NaF 15-20 I		161	37	2	0	0	0
NaF 0-15 I		167	28	5	0	0	0
NaF 0-20 I		149	43	6	1	1	0
NaF 20-65 I		159	36	5	0	0	0
NaF 15-65 I		139	52	5	3	1	0
NaF 0-65 I		149	43	6	1	1	0

Treko II		144	46	5	4	1	0
NaF 15-20 II		156	40	4	0	0	0
NaF 0-15 II		164	36	0	0	0	0
NaF 0-20 II		160	31	6	0	1	1
NaF 20-74 II		158	33	7	2	0	0
NaF 15-74 II		150	39	6	3	2	0
NaF 0-74 II		237	53	8	0	0	2

Abkürzungen der Versuchsserien siehe Material und Methode
(siehe Versuchsschema auf Seite 26)

TABELLE 23

Klassenhäufigkeiten der Translokationen (RB') in Trenimonkontrollen und Kombinationsversuchen (Versuch E)

Serie	Klasse	0	1	2	3	4	≥5
Treko I		170	24	4	2	0	0
NaF 15-20 I		182	17	1	0	0	0
NaF 0-15 I		180	19	1	0	0	
NaF 0-20 I		176	20	4	0	0	0
NaF 20-65 I		183	14	3	0	0	0
NaF 15-65 I		169	26	5	0	0	0
NaF 0-65 I		176	20	4	0	0	0

Treko II		174	20	4	1	1	0
NaF 15-20 II		188	11	1	0	0	0
NaF 0-15 II		186	12	2	0	0	0
NaF 0-20 II		172	26	1	0	0	1
NaF 20-74 II		183	15	2	0	0	0
NaF 15-74 II		178	22	0	0	0	0
NaF 0-74 II		267	27	5	1	0	0

Abkürzungen der Versuchsserien siehe Material und Methode
(siehe Versuchsschema auf Seite 26)

Lebenslauf

Renate Slacik-Erben

31. 3. 1948 in Würzburg geboren
- Herbst 1954 Eintritt in die Volksschule
- Herbst 1958 Wechsel in das Städtische Mozart-Gymnasium,
Neusprachlicher Zweig
- Juli 1967 Abitur
- WS 1967/68 Immatrikulation an der Universität Würzburg
in Biologie
11. 10. 1969 Vordiplom in Biologie (Zoologie, Botanik,
Chemie, Genetik)
- WS 1969/70 Wechsel zur Freien Universität Berlin
19. 7. 1973 Diplomprüfung in Biologie, Hauptfach
Allgemeine Biologie und Genetik
- WS 1973/74 Beginn mit der Doktorarbeit am Institut
für Genetik
- Ich bin seit 4. 5. 1972 verheiratet

